

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim gGmbH  
in Zusammenarbeit mit der  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt

Wirkung von Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und biomechanische  
Eigenschaften des Knochens–

Untersuchungen an einem Tiermodell ovariectomierter Ratten

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
Dr. med.  
(doctor medicinae)  
an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Katharina Gazis, geb. Becker  
aus Meißen  
Magdeburg 2014

## Dokumentationsblatt

### Bibliographische Beschreibung:

Gazis, Katharina:

Wirkung von Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und biomechanische Eigenschaften des Knochens– Untersuchungen an einem Tiermodell ovariectomierter Ratten - 2014. - 110 Bl. : 32 Abb., 44 Tab.

### Kurzreferat

Diese tierexperimentelle Studie untersuchte am Modell der ovariectomierten Ratte die direkten Auswirkungen des Chemotherapeutikums Docetaxel auf die Knochenmineraldichte (BMD) sowie die biomechanischen Eigenschaften. Zur Bestimmung der BMD wurden 3 unterschiedliche Verfahren- DXA, pQCT sowie  $\mu$ CT teils in vivo teils ex vivo im Bereich der Lendenwirbelkörper sowie Schenkelhalse und Diaphysen der Femora angewandt. Für die biomechanischen Tests wurden der Drei-Punkt-Biegetest im Bereich der Diaphysen der Femora, die Druckprüfung im Bereich der Hüftköpfe/ Schenkelhalse der Femora sowie der Wirbelkörperkompressionstest verwendet. Nach Sichtung aller Ergebnisse ergibt sich die Schlussfolgerung, dass beim Vorliegen einer durch Ovariectomie bedingten Osteoporose das Chemotherapeutikum Docetaxel zu einem weiteren Verlust der Knochenmineraldichte führen kann. Die Auswirkungen sind im Bereich der Lendenwirbelsäule größer als im Bereich der Schenkelhalse, im Bereich der Diaphysen der Femora zu vernachlässigen. Für diese Substanz wird ein direkter negativer Effekt auf den Knochen angenommen. Eindeutige negative Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften konnten nicht belegt werden.

Des Weiteren konnte die Wirksamkeit des Bisphosphonates Ibandronat in 2 unterschiedlichen Konzentrationen in Form eines Anstieges der Knochenmineraldichte sowie verbesserter biomechanischer Eigenschaften unter taxanhaltiger Chemotherapie am Tiermodell nachgewiesen werden.

## **Schlüsselwörter**

- Osteoporose
- Chemotherapie
- Chemotherapie und Osteoporose
- Chemotherapie und Veränderung biomechanischer Eigenschaften
- Taxane, Docetaxel und Osteoporose
- Bisphosphonate, Ibandronat

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Bedeutung der Studie	7
1.2 Das Ziel dieser Studie	8
1.3 Chemotherapie- Zytostatika	9
1.3.1 Allgemeines	9
1.3.2 Docetaxel	9
1.3.2.1 Wirkmechanismus	9
1.3.2.2 Präklinische Erfahrungen mit Docetaxel am Tiermodell Ratte	9
1.3.2.3 Klinische Erfahrungen mit Docetaxel	10
1.3.2.4 Zulassung von Docetaxel	11
1.4 Osteoporose	12
1.4.1 Definition und Diagnosekriterien	12
1.4.2 Häufigkeit der Erkrankung	12
1.4.3 Einteilung	13
1.4.4 Tumorthherapie und Osteoporose	13
1.4.4.1 Studienergebnisse zur Auswirkung von Zytostatika auf den Knochen	14
1.4.5 Diagnostik der Osteoporose	18
1.4.6 Therapie der Osteoporose	18
1.4.6.1 Bisphosphonate	18
1.4.6.1.1 Wirkmechanismus	18
1.4.6.1.2 Pharmakokinetik	19
1.4.6.1.3 Nebenwirkungen	20
1.4.6.1.4 Verwendung und Zulassung	20
1.4.6.2 Ibandronat (Ibandronsäure)- ein Aminobisphosphonat	21
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Tiermodell	22
2.2 Versuchsablauf	22
2.2.1 Einteilung in Gruppen	22
2.2.2 Zeitlicher Ablauf des Versuches	23
2.3 Chemotherapie (Docetaxel), Placebogabe, Ibandronatgabe	23
2.3.1 Voruntersuchung zur Dosisfindung	23
2.3.2 Docetaxel im Hauptversuch	24
2.3.3 Ibandronatgabe	24
2.4 DXA-Messungen der Lendenwirbelkörper	24
2.4.1 Vorbereitung- Sedierung der Ratten	25
2.4.2 Durchführung und Auswertung	25
2.5 Tötung der Tiere	26
2.6 Auswertungsverfahren: pQCT, $\mu$ CT und biomechanische Tests der Femora	26
2.6.1 Allgemeine Vorbereitung	26
2.6.2 Mikrocomputertomographie ( $\mu$ -CT)	27
2.6.2.1 Vorbereitung	27
2.6.2.2 Messung und Auswertung	27
2.6.3 Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT)	27

2.6.3.1 Vorbereitung	28
2.6.3.2 Messung und Auswertung	28
2.6.4 Dreipunkt-Biegetest in Schaftmitte der Diaphysen der Femora	29
2.6.4.1 Durchführung und Auswertung	29
2.6.5 Druckprüfung am Schenkelhals der Femora	30
2.6.5.1 Vorbereitung	30
2.6.5.2 Durchführung und Auswertung	31
<b>2.7 <math>\mu</math>CT und Kompressionstest der Lendenwirbelkörper</b>	<b>32</b>
2.7.1 Vorbereitung	32
2.7.2 $\mu$ CT der LWK 5	32
2.7.3 Wirbelkörperkompressionstests der LWK 5	32
<b>2.8 Statistische Auswertung</b>	<b>33</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 Knochendichtemessungen (DXA, pQCT, $\mu$ CT)	34
3.2 Biomechanische Tests (Dreipunktbiegung Diaphyse Femora, Kompressionstest LWK 5)	59
<b>4 Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1 Diskussion	65
4.2 Schlussfolgerungen	70
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>77</b>
- Tabelle zum zeitlichen Verlauf des Versuches	77
- Klinischer Verlauf des Tierversuches	78
- Tabellen zu nicht-signifikanten Ergebnissen	78
- Ergebnisse der Knochendichtemessungen Bereich Diaphyse (pQCT, $\mu$ CT)	84
- Ergebnisse der Druckprüfung am Schenkelhals	91
- Diskussion des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen	92
- Diskussion der Methoden	93
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>107</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>108</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A-CMF	Anthracycline-Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Fluorouracil
BMD	Bone Mineral Density; Knochenmineraldichte
BMC	Bone Mineral Content, Knochenmineralgehalt
CMF	Cyclophosphamid-Methotrexat-5-Fluorouracil-Kombination
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DXA	Dual-Energy-X-Ray Absorptiometry
DVO	Dachverband Osteologie
E2	Estradiol/Oestradiol
5-FU	5-Fluorouracil
Fmax	maximale Kraft
FR	Femora rechts
FL	Femora links
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HNLD	highest non-lethal dose
IL	Interleukin
Iband	Ibandronat
LWK	Lendenwirbelkörper
MTX	Methotrexat
μCT	Mikro-Computertomographie
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
OVX	Ovarektomie
pQCT	periphere Quantitative Computertomographie
PTH	Parathormon
ROI	region of interest
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
SERMs	Selektive-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
Sham	Scheinovarektomie
Tax	Taxotere® (Docetaxel)
TNF	Tumornekrosefaktor
G2/M-Phase	Phasen des Zellzyklus: G2-prämitotisch; M-Mitosephase
vs	versus
ZNS	Zentralnervensystem

# **1 Einleitung**

## **1.1 Bedeutung der Studie**

Durch neue Substanzen bzw. Chemotherapieschemata in der Krebstherapie sowie weiterentwickelter diagnostischer Möglichkeiten mit frühzeitigen Entdeckungen von Krebserkrankung gelingt es immer häufiger, diese kurativ zu behandeln oder zumindest eine Verlängerung der Überlebenszeiten zu erreichen. Dadurch treten Nebenwirkungen bzw. Langzeiteffekte der Chemotherapie folglich immer stärker in den Vordergrund. Bekannt ist, dass einige antineoplastische Substanzen über die Induktion eines Hypogonadismus zu Osteopenie bzw. Osteoporose mit dem Auftreten von Frakturen führen können (Fogelman I, et al. 2003; Letterie GS. 2004; Mahon SM 1998; Mathelin C, et al. 2008; McCunes JS, et al. 2005; Reid DM, et al. 2008; Shapiro CL, et al. 2001, 1997;).

Die direkte Wirkung von Chemotherapeutika auf den Knochen ist bisher kaum untersucht worden. Es finden sich in der Fachliteratur nur wenige Informationen darüber.

Nicht allein das bei Osteoporose gehäufte Auftreten von Brüchen und die damit verbundenen Komplikationen und immensen Kosten sind von Belang. Vor allem bei Osteoporose im Wirbelsäulenbereich leiden die Patienten sehr oft unter einer ausgeprägten Schmerzsymptomatik, die starke Auswirkungen auf die Lebensqualität hat (Ringe JD 1995). Deshalb sind bei diesen Risikopatienten eine diagnostische Abklärung und gegebenenfalls eine Osteoporosetherapie unbedingt erforderlich. Außerdem sind Knochenschmerzen immer ein Hinweis auf mögliche Metastasen bei einer Malignomanamnese und belasten die Patienten in besonderem Maße. Die differentialdiagnostische Abklärung, um zwischen direkter Wirkung zytotoxischer Medikamente auf den Knochen, Knochenmetastasen beziehungsweise Osteoporose zu unterscheiden, ist häufig schwierig und langwierig.

## **1.2 Das Ziel dieser Studie**

Ziel ist es zu untersuchen, ob Docetaxel, ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Taxane, am Modell der ovariectomierten Ratte eine direkte Veränderung am Knochen hinsichtlich der Knochenmineraldichte und der biomechanischen Eigenschaften bewirkt und ob eine gleichzeitige Gabe von Ibandronat, einem Bisphosphonat, in unterschiedlicher Dosierung dem entgegenwirken kann.

### **Konkrete Fragestellungen:**

- 1) Führt die Ovariectomie am Modell der Ratte zu einer Minderung der Knochenmineraldichte und zu Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens?
  
- 2) Hat das Chemotherapeutikum Docetaxel einen direkten Einfluss auf den Knochen hinsichtlich der Knochenmineraldichte und biomechanischer Eigenschaften?
  
- 3) Kann die gleichzeitige Gabe des Bisphosphonates Ibandronat einem eventuell schädigenden Einfluss von Docetaxel auf den Knochen entgegenwirken?



## **1.3 Chemotherapie- Zytostatika**

### **1.3.1 Allgemeines**

Chemotherapeutika sind natürlich vorkommende oder synthetisch hergestellte Stoffe, die ihre schädigende Wirkung möglichst gezielt auf bestimmte krankheitsverursachende Zellen beziehungsweise Mikroorganismen ausüben und diese abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen (Pschyrembel, S.265). Der Begriff Chemotherapie wird heute oft gleichbedeutend mit Zytostatikatherapie bei malignen Erkrankungen verwendet (Roche Lexikon Medizin, S.273). Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen im Wesentlichen durch ihr ungehemmtes Wachstum. Bei der Behandlung bösartiger Tumorerkrankungen nutzen die meisten Zytostatika die schnelle Teilungsfähigkeit der Tumorzellen, da diese empfindlicher als gesunde Zellen auf Störungen der Zellteilung reagieren. Es gibt phasenspezifische (Antimetabolite, Mitosehemmstoffe (wie Taxane)) und phasenunspezifische Zytostatika (Karow T, Lang-Roth R, 2003; S.661). Fast immer werden zwei oder mehr Zytostatika mit unterschiedlicher Wirkweise in verschiedenen Phasen des Zellzyklus kombiniert (Polychemotherapie), um einerseits die Wirksamkeit zu erhöhen und andererseits deren Nebenwirkungen zu verringern (Karow T, Lang-Roth R, 2003; S.661).

### **1.3.2 Docetaxel**

#### **1.3.2.1 Wirkmechanismus**

Docetaxel ist eine Substanz aus der Klasse der Taxane und wird in einem halbsynthetischen Verfahren aus einem Naturstoff aus *Taxus baccata L.* hergestellt. Docetaxel fördert durch Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit die Polymerisation von Tubulin und dessen Einbau in Mikrotubuli und blockiert die Depolymerisation der Mikrotubuli (Ringel und Horwitz 1991). Docetaxel ist vor allem während der G2/M-Phase des Zellzyklus wirksam. Es wirkt antiproliferativ und zytotoxisch (Hennequin et al. 1995).

#### **1.3.2.2 Präklinische Erfahrungen mit Docetaxel am Tiermodell Ratte**

Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Docetaxel an Maus und Ratte zeigten, dass die Substanz in Leber, Gallenblase, Magen, Dünndarm, Milz, Pankreas, Myokard, Knochenmark, Speicheldrüsen und die Reproduktionsorgane einschließlich fetales Gewebe und Muttermilch aufgenommen wird. Im ZNS war Docetaxel nicht nachweisbar (Bruno und Sanderink 1993; Bissery et al. 1995). Radioaktiv markiertes Docetaxel wird zu 84-89% bei Maus und Ratte (Marlard et al. 1993) sowie mehr als 95% beim Menschen (De Valeriola et al. 1993) an

Plasmaproteine gebunden. Die Metabolisierung der Substanz erfolgt in der Leber. Docetaxel und seine Metaboliten werden bei Tieren und Menschen vor allem über die Galle ausgeschieden (Marlard et al 1993). Bei der Ratte wurde ein geringer enterohepatischer Kreislauf gefunden (Gaillard et al. 1994; Gires et al. 1994). Die Hauptnebenwirkungen waren sowohl bei Einmalgabe als auch bei mehrfacher Anwendung bei Untersuchungen an Ratten, Hunden und Affen vergleichbar. Hier ist vor allem die negative Auswirkung auf das blutbildende System zu nennen. Bei der Ratte kam es zu Atrophie von Thymus und Keimdrüsen (Bissery et al. 1995). Bei allen Spezies erholten sich die hämatologischen Parameter innerhalb von 21 Tagen wieder. Außerdem führte Docetaxel bei trächtigen Ratten und Hasen zu einer vermehrten Zahl von Aborten, einem verringertem Fetalgewicht und einer verzögerten fetalen Ossifikation (Bissery et al. 1995).

### **1.3.2.3 Klinische Erfahrungen mit Docetaxel**

#### **Pharmakokinetik**

Die Pharmakokinetik entspricht einem 3-Kompartiment-Modell mit Halbwertszeiten von 4 Minuten, 36 Minuten sowie 11,1 Stunden für Verteilung und Elimination (Product Monograph Taxotere 2012). Alter und Geschlecht haben keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik. Mit einer Dosierung von 100 mg/m<sup>2</sup> als einstündige Infusion alle 3 Wochen wurde die höchste Dosisintensität mit akzeptablem Nebenwirkungsprofil erreicht. Bei dieser Dosis kommt es zu einer kurzen neutropenischen Phase (Bisset et al. 1993). Die Leberfunktion erwies sich als klinisch wichtiger Einflussfaktor. Es wird empfohlen, die Dosis von Docetaxel bei einer Erhöhung der Transaminasen auf über das 1,5-fache der oberen Norm sowie der alkalischen Phosphatase auf über das 2,5-fache der oberen Norm auf 75 mg/m<sup>2</sup> zu reduzieren (Product Monograph Taxotere 2012).

#### **Verteilung:**

Docetaxel verteilt sich in Leber, Galle, Magen, Dünndarm, Pankreas, Milz, Speicheldrüsen, Myokard, Knochenmark; Bindung an Plasmaproteine (Product Monograph Taxotere 2012).

#### **Metabolisierung:**

Die Metabolisierung erfolgt in der Leber vor allem durch Cytochrom-P450 CYP 3A zu 4 inaktiven Hauptmetaboliten (Product Monograph Taxotere 2012).

**Ausscheidung:**

Die Ausscheidung erfolgt vor allem über die Galle und Faeces, weniger als 10% über den Urin (Product Monograph Taxotere 2012).

**Nebenwirkungen:**

Häufigste und wichtigste dosislimitierende Nebenwirkung beim Menschen ist eine nicht kumulative und reversible Neutropenie (96,6% der Patienten). Bei 11,8% der Behandelten tritt Neutropenie mit Fieber auf. 25,9% der Patienten zeigen mäßige Überempfindlichkeitsreaktionen. Reversible Hautveränderungen traten bei 56,6% der Patienten auf. Bei 27,9% kam es zu Nagelveränderungen mit Ablösungen. Flüssigkeitsretention in Form von peripheren Ödemen, Pleura- und Perikardergüssen, Aszites und Tränenfluß traten bei 64,1% des Patientenkollektives auf. Gastrointestinale Nebeneffekte wie Übelkeit, Erbrechen, Anorexie, Diarrhoe, Obstipation und Stomatitis sind häufig. Auswirkungen auf das Nervensystem bildeten sich innerhalb von 3 Monaten zurück. Davon waren 50% neurosensorischer und 13,8% neuromotorischer Natur. Gelegentlich kam es zu Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem und die Leberfunktion (jeweils weniger als 5%). Häufig kam es zu Haarausfall (79%) und Asthenie (62,6%) (Product Monograph Taxotere 2012).

Eine Prämedikation mit Kortikoiden schützt signifikant vor hypertensiven Reaktionen und scheint die Besserung von Hautreaktionen und Flüssigkeitsretention zu unterstützen (Trudeau ME 1996).

Eine Veränderung am Knochen (veränderte Knochenmineraldichte, Veränderung in der Mikroarchitektur) wurde bisher nicht beschrieben.

**1.3.2.4 Zulassung von Docetaxel**

Erstmalige Zulassung von Docetaxel (Taxotere®, Rhône-Poulenc Rorer) in 15 europäischen Ländern im November 1995 und Ende Januar 1996 europaweit zur Therapie beim fortgeschrittenen Brustkrebs und fortgeschrittenem nichtkleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC, Non-small cell lung cancer). Weitere Zulassungen bis dato sind das androgenunabhängige (hormonresistente) metastasierte Prostatakarzinom, das metastasierte Adenokarzinom des Magens einschließlich Adenokarzinome der gastroösophagealen Übergangszone, das fortgeschrittene Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (SCCHN, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck ) sowie das fortgeschrittene Ovarialkarzinom.

## 1.4. Osteoporose

### 1.4.1 Definition und Diagnosekriterien (DVO-Leitlinie Osteoporose 2009)

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine mikroarchitektonische Verschlechterung des Knochengewebes charakterisiert ist, mit einem konsekutiven Anstieg der Knochenfragilität und der Neigung zu Frakturen. Sind bereits eine oder mehrere Frakturen als Folge der Osteoporose aufgetreten, liegt eine manifeste Osteoporose vor.

Es besteht eine negative Dysbalance zwischen Knochenresorption (Abbau des Knochens durch Osteoklasten) und Knochenformation (Knochenneubildung durch Osteoblasten). Die verschiedenen Skelettregionen sind in unterschiedlicher Ausprägung betroffen. Die Diagnosekriterien werden von der WHO wie folgt festgelegt (gültig für Knochendichtemessungen mittels DXA):

Normale Knochendichte	T-Score* > -1.0 SD
Osteopenie	T-Score* < -1.0 und > -2.5 SD
Osteoporose	T-Score* < -2.5 SD
schwere (manifeste) Osteoporose	T-Score* < -2.5 SD mit Fraktur

\* **“T-Score”**: Unterschied zwischen der Knochendichte (BMD) eines Patienten und der mittleren Knochendichte eines jungen (30 Jahre), gesunden Probandenkollektivs gleichen Geschlechts in Standardabweichungen (SD).

• **“Z-Score”**: Unterschied zwischen der Knochendichte (BMD) eines Patienten und der mittleren Knochendichte eines gleich-alten, gesunden Probandenkollektivs gleichen Geschlechts in Standardabweichungen (SD).

### 1.4.2 Häufigkeit der Erkrankung

In Europa, den vereinigten Staaten von Amerika und Japan sind schätzungsweise 75 Millionen Menschen an generalisierter Osteoporose erkrankt (Ringe 1997). Weltweit leiden mindestens 200 Mio. Menschen an Osteoporose (Bonney 1996). Nach einer retrospektiven Analyse anonymisierter Abrechnungsdaten einer großen gesetzlichen Krankenkasse betrug die Prävalenz der Osteoporose bei über 50-Jährigen 2009 in Deutschland 14% insgesamt, bei

Frauen 24% und bei Männern 6% (Hadji P, et al. 2013). Hochgerechnet auf Deutschland ergeben sich 6,3 Mio. Betroffene im Jahr 2009. Die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland wird auf 885000 jährlich geschätzt. Die Neuerkrankungsrate bei über 50-Jährigen liegt bei 2,1%. 52% der Betroffenen hatten innerhalb des Beobachtungszeitraumes (2006-2009) Frakturen, viele davon Mehrfachfrakturen (Hadji P, et al. 2013).

Die Osteoporoseerkrankung wird häufig erst dann festgestellt, wenn eine Fraktur auftritt. Dies führt zu hohen Kosten für das Gesundheitssystem (Götte und Dittmar 2001; Konnopka A, et al. 2009).

### 1.4.3 Einteilung

Die **Einteilung** kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Die am häufigsten verwendete ist die Einteilung nach ihrer Ätiologie. Hierbei wird zwischen **primärer** – hierzu zählen die idiopathische Form, die juvenile Form, die postmenopausale Osteoporose (Typ I) sowie die senile Osteoporose (Typ II) - und **sekundärer** Osteoporose aufgrund verschiedener Grunderkrankungen oder der Behandlung mit Medikamenten, wie beispielsweise Chemotherapeutika, unterschieden (Pschyrembel 258. Auflage S.1172). Die in der Literatur beschriebenen Zahlen zur Häufigkeit, an einer sekundären Osteoporose zu erkranken, differieren teilweise sehr stark. Der Anteil wird bei Frauen im Durchschnitt mit bis zu 30 % eingeschätzt, wobei der Prozentsatz, eine sekundäre Form der Osteoporose zu bekommen, bei Männern mit 30–60 % weitaus höher liegt (Stupphann D, Pietschmann P. 2008). Sekundäre Osteoporosen umfassen insgesamt nur 5% aller Osteoporosefälle (Bartl R, Frisch B; Kapitel 4, S. 53, 2001).

### 1.4.4 Tumortherapie und Osteoporose

**Die Ursachen** für die Entstehung einer Osteoporose unter Tumortherapie sind vielfältig:

- therapieinduzierter Hypogonadismus mit resultierendem Östrogenmangel
- hoch dosierte Glukokortikoidtherapie
- toxische Effekte der Zytostatika am Knochen selbst (bisher wenig untersucht)
- Strahlentherapie
- Immobilisation
- Mangelernährung
- depressive Stimmungslage

(Aufzählung modifiziert nach Bartl R 2006)

Ein weiterer Aspekt ist, dass eine Krebserkrankung möglicherweise selbst Knochenverlust induziert (Delmas PD, Fontana A, 1998). Studien mit biologischen Markern des Knochenstoffwechsels haben gezeigt, dass es bei Patienten mit Krebs ohne Knochenmetastasen eine gesteigerte Knochenresorption gibt. Brustkrebs und andere Tumore erhöhen die Osteoklastenaktivität wahrscheinlich durch eine erhöhte Freisetzung von TGF alpha oder beta, PTHrP und Cytokinen (Delmas PD, Fontana A, 1998).

Bekannt ist, dass Zytostatika wie Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil und Doxorubicin über die Induktion eines Hypogonadismus und den dadurch bedingten Östrogenmangel bei der Frau zum Verlust der Knochenmasse führen können (Reid DM, et al. 2008; Mathelin C, et al. 2008; McCunes JS, et al. 2005; Letterie GS. 2004; Fogelman I, et al. 2003; Shapiro CL, et al. 2001; Hadji P, et al. 2009). Des Weiteren ist bekannt, dass Hypogonadismus beim Mann einen Knochenverlust mit einem durchschnittlichen Abfall der BMD von 7% pro Jahr während der ersten 2 Jahre bewirkt (Stepan J, et al. 1989).

#### **1.4.4.1 Studienergebnisse zur Auswirkung von Zytostatika auf den Knochen**

Greep NC, et al. 2003 verglichen die Knochenmineraldichte mittels DXA im Bereich von Lendenwirbelsäule und der Hüfte von postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs, die postoperativ chemotherapeutisch behandelt wurden (n=36) mit denen, die keine adjuvante Chemotherapie erhielten (n=89). Patienten mit adjuvanter Chemotherapie erhielten **Cyclophosphamid, Methotrexat (MTX)** und **5-Fluorouracil** oder **Adriamycin** und **Cytosan**. Die Knochenmineraldichte an Hüfte, Femur, Trochanter und Wirbelkörpern war bei Frauen, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten, durchschnittlich 0,5 SD niedriger als bei der Vergleichsgruppe ohne Chemotherapie, obwohl die Patientinnen mit Chemotherapie durchschnittlich 6 Jahre jünger waren. Greep NC, et al. schlussfolgern, dass eine adjuvante Chemotherapie sich bei postmenopausalen Frauen ungünstig auf den Knochen auswirkt, möglicherweise durch einen direkten oder indirekten toxischen Effekt der Chemotherapie auf den Knochen zusätzlich zum Östrogenmangel der Menopause oder der Chemotherapie-induzierten Ovarialinsuffizienz (Greep NC, et al. 2003).

**MTX** wird bei verschiedenen malignen Erkrankungen eingesetzt. Der negative Einfluss von hochdosierten MTX auf die Knochenmasse scheint durch eine gesteigerte Knochenresorption begleitet von einer gehemmten Knochenformation zu entstehen. Es resultiert in einem massiv ungekoppeltem Knochen-turnover (Friedlaender GE et al. 1984; May KP et al. 1994; Wheeler

DL, et al. 1995). MTX induziert die zelluläre Depletion von reduzierten Folaten, was letztlich zur Hemmung der DNA-Synthese führt. Die Hemmung der Knochenformation resultiert wahrscheinlich aus einer reduzierten Rekrutierung von Osteoblasten aus proliferativen Präkursorzellen (Van der Veen, et al. 1996). Des Weiteren verringert MTX die Mineralisierung der Knochenmatrix (May KP, et al. 1996) und steigert die Knochenresorption (May KP, et al. 1994; Wheeler DL, et al. 1995). Der Mechanismus, der zu gesteigerter Knochenresorption führt, ist allerdings noch unklar. MTX hemmt die IL-1-beta-Synthese und stimuliert die Freisetzung von IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Seitz M, et al. 1998) und vermindert die Knochenmineraldichte in den Wirbelkörpern signifikant um 8% (Spadaro JA et al. 2006). Außerdem reduziert MTX die Knochenfestigkeit, was anhand biomechanischer Tests an Rattenfemora nachgewiesen wurde (Nowińska B, et al., 2007). Die Behandlung mit MTX induziert bei Kindern signifikant eine Osteozytenapoptose in der primären Spongiosa und reduziert die Proliferation der Osteoblasten und Präosteoblasten insbesondere in der sekundären Spongiosa (Xian CJ et al. Aug. 2007). Die Häufigkeit von Frakturen, die bei Kindern mit Leukämie unter MTX-Therapie auftreten, wird zwischen 12-45% angegeben (Pfeilschifter J, Diel IJ 2000b).

Eine niedrig-dosierte Therapie mit MTX, wie bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis, scheint keinen beschleunigten Knochenmasseverlust zu verursachen (Carbonare LD, et al. 1999).

**Doxorubicin** gehört zur Klasse der Anthracycline, welche Plasmamembranfunktionen modifizieren. In Tierversuchen konnte ermittelt werden, dass Doxorubicin das trabekuläre Knochenvolumen mindert und die Knochenformationsrate um fast 60% erniedrigt (Friedlaender, et al. 1984; Young DM, et al. 1975). In vitro hemmt Doxorubicin die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung von Mäuseosteoblasten (Glackin CA, et al. 1992).

Die direkten Effekte der Kombination beider Chemotherapeutika **Doxorubicin** und **MTX** auf den Knochen wurden von Friedlaender GE, et al. 1984 an 35 Ratten untersucht. Die Tiere erhielten 5 Tage lang täglich entweder MTX (n=10) oder Doxorubicin (n=12) oder Placebo (n=13) intraperitoneal und wurden nach 14 Tagen getötet. Mit histomorphometrischen Analysen der proximalen Schwanz-Wirbelkörper wurde der Knochen auf Veränderungen der Knochenmasse, auf Knochenformation und -resorption untersucht. Die Rate der Osteoidmineralisation war bei den Chemotherapiegruppen leicht verringert. Das trabekuläre Knochenvolumen war bei beiden Agentien im Vergleich zur Placebogruppe merklich reduziert (MTX 26,9%; Doxorubicin 11,5%) und die Knochenformationsrate war

durchschnittlich 60% geringer. Der Anteil der trabekulären Oberfläche, die mit aktiven Osteoblasten und Osteoid bedeckt ist, hat sich nicht von der Kontrollgruppe unterschieden, was zur Annahme führt, dass die von Osteoblasten produzierte Matrixmenge vermindert wurde. Parameter der Knochenresorption waren erhöht bei Methotrexat, nicht aber bei Doxorubicin (Friedlaender GE, et al. 1984).

An neonatalen und juvenilen Ratten konnte festgestellt werden, dass **Cyclophosphamid**, ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der alkylierenden Substanzen, die Anzahl sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten an der Knochenoberfläche der Mandibularkondylen mindert und Osteopenie verursacht (Wang TM, Shih C 1986).

**Cyclophosphamid** induziert die Apoptose in der Proliferationszone. Obwohl die Osteoblastenzellfläche verringert wird, wird das trabekuläre Knochenvolumen in der Metaphyse nicht signifikant verändert. Andererseits reduziert die akute Chemotherapie mit beiden Substanzen bei Kindern die Höhe sowohl der primären und sekundären Spongiosa des trabekulären Knochens (Xian CJ et al. Feb. 2007).

Die Studiengruppe um Cegiela U, et al. zeigte 2003 bei der Untersuchung von mit **Cyclophosphamid** behandelten männlichen Ratten, dass Cyclophosphamid das Remodeling des Knochengewebes stört. Es kommt zu einer Verminderung der Knochenmasse sowie der Knochendichte sowie verminderter mechanischer Stärke der Rattenfemura (Cegiela U, et al. 2003).

**Isofosfamid** gehört wie Cyclophosphamid zur Gruppe der alkylierenden Substanzen. Es wird zur Behandlung solider Tumoren bei Kindern eingesetzt, vor allem beim Osteosarkom. Bekannt ist, dass Isofosfamid in Dosierungen  $> 50\text{g}/\text{cm}^2$  oder in Kombination mit Cisplatin einen temporären oder permanenten Schaden am proximalen Tubulus der Niere verursachen kann, was zu renalem Phosphatverlust mit metabolischer Azidose und Hyperkalzieurie und resultierender hypophosphatämischer Osteomalazie führt (Pfeilschifter J, Diel IJ 2000b). Aber der nephrotoxische Effekt scheint nicht der einzige Mechanismus zu sein, der zu einer reduzierten Knochenmineraldichte führt. De Schepper et al. 1994 stellten bei Kindern, die Isofosfamid erhalten hatten, eine verminderte Knochenmineraldichte der Lendenwirbelkörper, teilweise weniger als -2SD, fest, obwohl keiner von ihnen klare Zeichen einer Osteomalazie zeigte. Mit Isofosfamid behandelte Kinder haben niedrige Osteocalcinwerte, was zur Annahme führt, dass die Knochenformation möglicherweise gestört ist (De Schepper et al. 1994).

Cegiela U, et al. (Nov-Dec 2004) zeigten in ihrer Studie mit männlichen Ratten, dass **5-FU** die Knochenremodelingprozesse des Knochens stört, meistens durch Beeinträchtigung der



Knochenmatrixsynthese, was zur Störung der Mineralisierung führt. Auch die mechanische Stärke der Femura der Tiere war vermindert, was anhand des 3-Punkt-Biegetests der Femordiaphyse und der Druckprüfung des Schenkelhalses getestet wurde (Cegiela U, et al. 2004 Nov-Dec).

In einer Studie an männlichen Ratten, welche mit **Etoposid** behandelt wurden, konnte Cegiela U, et al. (May-Jun 2004) ebenfalls feststellen, dass diese Substanz den Knochenumbau während des Prozesses der Knochenformation direkt beeinflusst, und dadurch die Mineralisierung stört. Dies führt zu verminderter mechanischer Belastbarkeit des Femurs und zur Entwicklung von Osteopenie (Cegiela U, et al. 2004 May-Jun). In einer Untersuchung bei mit **Etoposid** behandelten Kindern zeigte sich, dass die Substanz die Chondrozytenproliferation unterdrückt und die Höhe sowohl der primären und sekundären Spongiosa trabekulären Knochens reduziert (Xian CJ et al. Feb. 2007).

Die klinische Studie von Cameron DA, et al. 2010 zeigt, dass verschiedene adjuvante systemische Chemotherapien -darunter auch Taxane- einen schädlichen Effekt auf die Knochenmineraldichte (BMD) bei prämenopausalen Frauen mit frühem Brustkrebs unabhängig von der Auswirkung auf die Ovarialfunktion haben (Cameron DA, et al. 2010). 41 prämenopausale Frauen, die an frühem Brustkrebs erkrankt waren, erhielten eine adjuvante Kombinationschemotherapie (3 Frauen **CMF**, 27 **A-CMF**, 11 **Anthracyclin plus Taxan**). Die mittels DXA ermittelte BMD im Bereich der Lendenwirbelsäule war nach 6 Monaten in allen Therapieschemata signifikant niedriger zwischen -6,6% bis -2,48%, obwohl das Serum-E2 während der ersten 6 Monate unverändert blieb. Etwas geringfügiger verminderte sich die BMD im Bereich der Hüfte ebenfalls bei allen Patienten zwischen -2,56 und -1,61%. Während der weiteren 6 Monate kam es nur noch bei den Frauen zu einer weiteren Minderung der BMD, die einen Serum-E2-Spiegel <150pmol/l hatten. Diese 23 Frauen waren alle älter als 40 Jahre (Cameron DA, et al. 2010).

### **Taxane**

Es ist nicht bekannt, ob Taxane wie Docetaxel und Paclitaxel einen direkten Einfluss auf den Knochen haben.

Docetaxel führt bei trächtigen Ratten zu einer verzögerten Ossifikation (Bissery et al. 1995). Inoue K 2005 zeigte, dass Docetaxel die Proliferation und Aktivität von Mäuseosteoklasten in vitro hemmt und deren Apoptose induziert. Minidronat, ein Bisphosphonat, hemmt ebenfalls die Proliferation und Aktivität von Osteoklasten und steigert die Wirkung von Docetaxel auf Osteoklasten (Inoue K 2005).

### 1.4.5 Diagnostik der Osteoporose

Die Diagnosestellung einer Osteoporose erfordert aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes und der vielfältigen Ursachen die Kombination mehrerer Untersuchungen. Dazu gehören **Anamnese, körperlicher Untersuchung, Labordiagnostik, eine konventionelle Röntgenaufnahme** und die **Osteodensitometrie** (DVO-Leitlinie Osteoporose 2009). Die DXA gilt als Goldstandard. Ebenso können eine Knochenhistologie (Biopsie) oder eine Skelettszintigraphie erforderlich sein (DVO-Leitlinie Osteoporose 2009).

### 1.4.6 Therapie der Osteoporose

Die Therapie der Osteoporose muss individuell auf die Bedürfnisse des Patienten angepasst werden. Das primäre Ziel einer Osteoporosetherapie ist, Frakturen zu vermeiden und Schmerzen zu lindern. Eine erfolgreiche Behandlung der Osteoporose umfasst viele verschiedene Komponenten, zum Beispiel Schmerz- und Bewegungstherapie, knochenbewußte Ernährung (1000mg Kalzium täglich, Nikotinkarenz, BMI>20), Sturzprophylaxe, regelmäßige Sonnenlichtexposition (30 Minuten täglich), und die Gabe knochenprotektiver bzw. –aufbauender Medikamente (DVO-Leitlinie Osteoporose 2009).

Laut DVO-Leitlinie Osteoporose von 2009 besteht die Indikation für eine spezifische **medikamentöse Therapie**, wenn das Risiko osteoporotischer Frakturen für die nächsten 10 Jahre die 30%-Schwelle übersteigt, da dann der Nutzen der Therapie erheblich eventuelle Therapierisiken aufwiegt und wenn die T-Werte der DXA-Messung an Lendenwirbelsäule, proximalem Gesamtfemur oder am Schenkelhals erniedrigt sind. **Die medikamentöse Behandlung der Osteoporose** besteht aus der Basistherapie mit Vitamin D 3 oral 800-2000IE täglich inklusive 1000mg Kalzium oral täglich (Prophylaxe und Therapie). Des Weiteren kommen Selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMs: Raloxifen), Parathormon (PTH 1-84), Teriparatid (PTH 1-34), Strontiumranelat, Fluoride, Calcitonin und Bisphosphonate zum Einsatz (DVO-Leitlinie Osteoporose 2009).

#### 1.4.6.1 Bisphosphonate

##### 1.4.6.1.1 Wirkmechanismus

Bisphosphonate sind endogene Pyrophosphatanaloga, in welchen das zentrale Sauerstoffatom durch Kohlenstoff ersetzt ist (Bartl R, Frisch B. 2001; S. 27). Durch die Anlagerung an die Knochenoberfläche hemmen Bisphosphonate einerseits die Mineralisation der Knochensubstanz, andererseits hemmen sie den Knochenabbau durch Hemmung der

Osteoklasten. Sie können Biomembranen nur sehr schwer überwinden, die Osteoklasten nehmen sie aber durch Phagozytose im Rahmen des Abbaus von Knochensubstanz auf. Nicht Stickstoff-haltige Wirkstoffe (z.B. Etidronat, Clodronat) scheinen dies über die Bildung von toxischen ATP-Analoga zu bewirken. Die stickstoffhaltigen Aminobisphosphonate (z.B. Alendronat, Pamidronat, Ibandronat, Zoledronat) hemmen die Farnesylpyrophosphat-Synthase (Green JR 2004). Die Produkte dieses Enzyms, Farnesyl- und Geranylpyrophosphat, werden benötigt, um kleine G-Proteine (u.a. Ras) in der Zellmembran zu verankern. Fehlen diese G-Proteine, haben an Zellrezeptoren gebundene Wachstumsfaktoren keine Auswirkung auf die Zelle mehr. Infolgedessen sterben die Osteoklasten im Rahmen der Apoptose ab (Green JR 2004). Bisphosphonate werden durch ihre hohe Bindungsaffinität zum Hydroxylapatit in den Knochen eingelagert (Wüster et al. 2002). Das Ausmaß der Knocheneinlagerung von verschiedenen Bisphosphonaten ist unterschiedlich. Insgesamt sinkt die Aktivierungsfrequenz von neuen Remodelling-Einheiten (Wüster et al. 2002). Einige In-vitro-Experimente zeigen auch einen direkt inhibierenden Effekt auf die osteoklastenstimulierenden Wachstumsfaktoren aus Osteoblasten (Wüster, et al 2002). Bisphosphonate haben auch einen Anti-Tumor-Effekt (Bauss F, Body JJ 2005; Clézardin P, et al. 2003). Bisphosphonate hemmen die Tumorzelladhäsion an mineralisierten Knochen wie auch die Tumorzellinvasion und –proliferation. Bisphosphonate induzieren ebenfalls die Tumorzellapoptose und stimulieren die T-Zell-Zytotoxizität gegen Tumorzellen. In vivo hemmen Bisphosphonate die Formation von Knochenmetastasen und reduzieren die Tumorausbreitung im Knochen. Ergänzend sei gesagt, dass Bisphosphonate die experimentelle Angiogenese in vitro und in vivo hemmen (Clézardin P, et al. 2003). Tumorzellen im Knochen, besonders Metastasen von Brustkrebs, Prostatakrebs und dem Multiplen Myelom, können die Osteoklastenformation und –aktivität stimulieren. Bisphosphonate haben apoptotische und antiproliferative Wirkung auf Osteoklasten und bewirken ähnliche Effekte an Makrophagen und Tumorzellen. (Heidenreich A, Ohlmann CH 2004).

#### **1.4.6.1.2 Pharmakokinetik**

Die Pharmakokinetik von Bisphosphonaten wurde von Wüsterer et al. 2002 in einer Übersichtsarbeit ausführlich beschrieben. Hier einige Eckdaten aus dieser Veröffentlichung, die auch für die eigene Arbeit relevant sind: Bisphosphonate werden im Darm schlecht resorbiert und bilden mit Calcium unlösliche Komplexe. Die Resorptionsquote nach oraler Einnahme liegt je nach Präparat zwischen 1 und 10 % der eingenommenen Dosis, teilweise ist

sie noch geringer. Die Halbwertszeiten im Blut betragen nur 20-25 min. Etwa 20-50 % der resorbierten Menge wird im Knochen gespeichert. Sie werden nicht metabolisiert und unverändert innerhalb von 24 h durch den Urin oder Stuhl ausgeschieden. Die Halbwertszeit der Bisphosphonate im Skelett beträgt viele Jahre, ähnlich wie bei Tetrazyklinen oder Strontium. Dadurch wird der lang andauernde Effekt auf die Knochenresorption erklärt. Allerdings werden die Bisphosphonate ungleichmäßig verteilt und manche erscheinen nur in den Zonen mit erhöhtem Umbau. Bereits früh nach Therapiebeginn kommt es zu einer Verminderung der Knochenresorptionsmarker, insbesondere der freien Pyridinoline im Urin.

#### **1.4.6.1.3 Nebenwirkungen**

Bartl R und Frisch B haben in ihrem Buch „Das Bisphosphonat-Manual Wirkungen Indikationen Strategien Trends“ (2001; S. 43-47) mögliche Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Bisphosphonaten zusammengefasst. So treten bei oraler Gabe bei zwei bis zehn Prozent der Patienten gastrointestinale Beschwerden auf. Durch Komplexbildung mit Kalziumionen im Darm können gelegentlich Hypokalzämien vorkommen. Weitere mögliche Nebenwirkungen von Bisphosphonaten sind Verwirrtheit sowie optische, akustische und olfaktorische Halluzinationen. Vor allem zu Beginn der Therapie können Muskelschmerzen auftreten.

#### **1.4.6.1.4 Verwendung und Zulassung**

Von Bisphosphonaten ist bekannt, dass sie den postmenopausalen Knochenmasseverlust hemmen können. Der stärkste Knochendichteanstieg findet in den ersten zwei Jahren statt (Wüster et al 2002). Bereits nach einem Therapiejahr sinkt die Zahl der vertebrealen und extravertebralen Knochenbrüche um 50% (Bartl R, Frisch B 2001 S.69). Bisphosphonate sind in Deutschland zur Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen, des Osteodystrophia deformans und der Tumor-assoziierten Hyperkalzämie zugelassen. Darüber hinaus finden sie Einsatz bei Knochenmetastasen. In 21 randomisierten Studien an Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs und Knochenmetastasen (osteolytisch und /oder gemischt osteolytisch/osteoblastisch) konnte unter der Anwendung von Bisphosphonaten ein um 17 % vermindertes Risiko für Knochenbrüche ermittelt werden (Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. 2005). In der Cochrane-Metaanalyse von Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. 2005 zeigte sich in 7 Studien, dass Patientinnen unter Einnahme von Bisphosphonaten über reduzierten Knochenschmerz berichtet. 3 Studien berichten über eine

Verbesserung der Lebensqualität. Das Überleben der Frauen bleibt von der Einnahme von Bisphosphonaten unberührt.

Aminobisphosphonate sensibilisieren Makrophagen für inflammatorische Stimuli, die eine Akutphaseantwort induzieren (Santini D, et al. 2004). Bisphosphonate ohne Aminogruppe hemmen wahrscheinlich die inflammatorische Antwort auf Makrophagen durch Hemmung der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie IL-6, TNF  $\alpha$  und IL-1. Diese antiinflammatorische Aktivität der Nicht-Aminobisphosphonate legt deren möglichen Einsatz bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen wie der erosive rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis, Ankylosierender Spondylitis, Myelofibrose und hypertrophe pulmonale Osteoarthropathie nahe (Santini D, et al. 2004).

#### **1.4.6.2 Ibandronat (Ibandronsäure)**

Ibandronat wird vor allem bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose mit erhöhtem Frakturrisiko eingesetzt.

Dass Ibandronat einen statistisch signifikanten Rückgang der Frakturrate bei der Osteoporose bewirkt, hat unter anderem die BONE-Studie (Oral Ibandronate Osteoporosis Vertebral Fracture Trial in North America and Europe, Phase-III-3-Jahresstudie) mit 2 946 postmenopausalen Frauen ergeben (Cooper C 2006; Vetter 2005). Die Patientinnen wurden drei Jahre lang placebokontrolliert mit entweder täglich 2,5 mg Ibandronat oral oder intermittierend mit 20 mg der Substanz behandelt, und zwar zwölfmal alle drei Monate.

Es konnte eine signifikante Reduktion des vertebrealen Frakturrisikos um 62% sowohl bei täglicher Gabe von 2,5mg Ibandronat und intermittierend 20mg alle 3 Monate im Vergleich zur Placebogabe demonstriert werden. In einer post hoc Analyse einer Untergruppe von Patientinnen mit einem Schenkelhals-BMD T-score  $<-3,0$  zeigte, dass täglich verabreichtes Ibandronat das Risiko nichtvertebraler Frakturen signifikant reduziert ( $p=0.012$ ). Beide Therapieregimes -täglich versus intermittierend- sind mit einem signifikanten Anstieg der BMD der Lendenwirbelsäule und des proximalen Femurs und der Normalisation des Knochenstoffwechsels assoziiert (Cooper C 2006; Vetter 2005).

Ibandronat zeigt sich wirksam und tolerabel wenn es einmal täglich (oral), einmal wöchentlich (oral), einmal monatlich oder alle 3 Monate (i.v.) verabreicht wird (Schimmer RC, Bauss F 2003; Guay DR 2005; Vetter 2005).

Der Hauptvorteil intravenöser Bisphosphonate ist ihre renale Sicherheit (Guay DR 2006; Wüster et al. 2002).

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Tiermodell

Die Studie wurde mit 86 gleich alten, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten derselben Zucht durchgeführt. Bis auf die Tiere der Kontrollgruppe (Scheinovarektomie = Sham) wurden die Ratten im Alter von 6 Monaten ovariectomiert (OVX). Im Alter von 32 Wochen kamen die Versuchstiere in der Zentralen Forschungseinrichtung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt an. Sie hatten alle ein vergleichbares Körpergewicht. Die Zuteilung zu den einzelnen Gruppen erfolgte randomisiert. Unterbringung, Fütterung und Behandlung aller Tiere waren gleich. Wasser stand den Ratten ad libitum zur Verfügung. 7 Wochen nach Ankunft der Tiere begann der Versuch (siehe Therapieschema Tab. 1 sowie Tabelle 2 zum zeitlichen Ablauf). Vor jeder Injektionsbehandlung wurden Gewichtsbestimmungen durchgeführt. Die Gabe der Docetaxel- sowie Ibandronatdosis erfolgte gewichtsadaptiert.

### 2.2 Versuchsablauf

#### 2.2.1 Einteilung in Gruppen

Bei Versuchsbeginn wurden die 86 Tiere -4 waren bereits im Vorfeld verstorben- in 5 verschiedene Gruppen mit je 14 bis 22 Tieren bis auf die scheinovarektomierte Kontrollgruppe per Randomisierung eingeteilt. Die Gruppen ergaben sich aus den unterschiedlichen Therapieschemata (Tabelle 1).

Gruppe	Tierzahl n	Ovariectomie (OVX)	Schein- ovarektomie (Sham)	Taxotere	Placebo	Ibandronat	
						1µg/kg	25µg/kg
1	15	+		+		+	
2	15	+		+			+
3	22	+		+			
4	20	+			+		
5	14		+		+		

**Tabelle 1:** Therapieschema der einzelnen Gruppen

Die Ratten wurden mit Hilfe von nummerierten Ohrmarken gekennzeichnet, die in Inhalationsnarkose mittels einer Klippzange angebracht wurden. Dazu wurden die Tiere in einen 22cm hohen und 21cm im Durchmesser großen Glasbehälter gesetzt, an dessen Boden sich ein mit ca. 5ml Enfluran (Ethrane; Fa. Abbott GmbH; Wiesbaden) getränktes Zellstoffpapier befand. Der Behälter wurde mit einem Deckel verschlossen und das Tier solange darin belassen (ca. 1 Minute), bis dieses völlig in sich zusammensank. Die Tiere erholten sich binnen weniger Minuten.

### **2.2.2 Zeitlicher Ablauf des Versuches**

siehe Tabelle 34 im Anhang S.77

### **2.3 Chemotherapie (Docetaxel), Placebogabe, Ibandronatgabe**

Die Gabe der Chemotherapie Docetaxel (Taxotere®; Studie EORTC 40984; Brüssels) erfolgte bei 4 der 5 Gruppen in 6 Zyklen im Abstand von jeweils 3 Wochen. Da für Ratten noch keine Langzeit-Dosis-Toxizitätsstudie durchgeführt wurde, stellten wir dem Hauptversuch eine Voruntersuchung voran.

#### **2.3.1 Voruntersuchung zur Dosisfindung Docetaxel**

Die Voruntersuchung wurde mit 12 Tieren der gleichen Rasse und gleichen Alters durchgeführt. Ihr Durchschnittsgewicht betrug 355g. Diese 12 Tiere teilten wir in 4 Gruppen mit je 3 Ratten auf. Nach Einzeldosis-Toxizitätsstudien (Bissery et al. 1995) beträgt die HNLD (highest non-lethal dose) von Docetaxel bei Ratten 60 mg/m<sup>2</sup>, was laut angegebenem Umrechnungsfaktor einer Konzentration von 10 mg/kg entspricht. 3 der 4 Gruppen bekamen nun in 6 Zyklen im Abstand von 3 Wochen Docetaxel intraperitoneal in folgenden Dosierungen: Gruppe 1: 5,5 mg/kg, Gruppe 2: 8,5 mg/kg und Gruppe 3: 10 mg/kg.

Die 4. Gruppe diente als Vergleichsgruppe. Alle Tiere bis auf eine Ratte aus der 8,5 mg/kg-Gruppe überlebten die 6 Zyklen bei gutem Allgemeinzustand.

Deshalb entschieden wir uns, den Hauptversuch mit einer Dosierung von 10 mg/kg Docetaxel durchzuführen, da bei höherer Dosis auch eine stärkere Auswirkung auf den Knochen anzunehmen war.

### 2.3.2 Docetaxel im Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde die erste intraperitoneale Gabe der Chemotherapie (Docetaxel) gewichtsadaptiert in der 8. Woche nach Ankunft der Tiere in der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt/M. durchgeführt. Der 2.-6. Zyklus erfolgte in den Wochen 11, 14, 18, 21 und 24. Da Docetaxel schlecht wasserlöslich ist, muß die Infusionslösung vor jeder Verabreichung frisch hergestellt werden. Dies geschah durch unsere Betreuerin Frau Dr. med. Anja Müller, damals Oberärztin in der Frauenklinik der Universität Frankfurt.



**Abb. 1** Intraperitoneale Injektion des Chemotherapeutikums

### 2.3.3 Ibandronatgabe

Die Ibandronatgabe (Bondronat®; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) wurde ab der 9. Woche nach Ankunft der Ratten in der Forschungseinrichtung Frankfurt/M. bis zur Tötung der Tiere bei 2 der 5 Gruppen einmal wöchentlich subkutan durchgeführt. Der Wirkstoff wurde in Konzentrationen von 1 µg/kg sowie von 25 µg/kg eingesetzt.

### 2.4 DXA- Messungen der Lendenwirbelkörper

Zu Beginn des Versuches am Ende der 7. Woche (vor der ersten Chemotherapiegabe) und weiterhin Ende der 16., 25., 30. sowie 35. Woche nach Ankunft in der Forschungseinrichtung Frankfurt/M. wurden am DXA-Gerät (Hologic QDR 4500+, animal software) der Orthopädischen Universitätsklinik Stiftung Friedrichsheim Messungen in vivo durchgeführt. Mit der DXA-Methode (=Dual-Energy-X-Ray Absorptiometry) wird die Knochenmineraldichte (BMD-bone mineral density) quantitativ in g/cm<sup>2</sup> bestimmt. Die Werte



entsprechen nicht der physikalischen Dichte, die in  $\text{g/cm}^3$  angegeben wird, sondern einer Flächendichte.

### 2.4.1 Vorbereitung- Sedierung der Ratten

Vor den Messungen der Ratten wurde die Funktionsfähigkeit des Gerätes durch eine Phantommessung überprüft. Die Sedierung der Ratten erfolgte gewichtsadaptiert über eine intraperitoneale Injektion von 1 ml/kg eines Gemisches aus einem Anteil Xylazin 5 mg/kg (Rompun® 2%ig; Fa. Bayer) und 3 Anteilen Ketamin 75 mg/kg (Ketavet® 100mg; Fa. Pharmacia und Upjohn GmbH; Erlangen).

### 2.4.2 Durchführung und Auswertung



**Abb. 2** Haltevorrichtung für die Ratten zur DXA-Messung

Die sedierte Ratte wurde in eine spezielle Halterung (s. Abb.3.1) so eingespannt, dass die Wirbelsäule gerade ausgerichtet und gestreckt wird. Der Scan erfolgte im small animal mode, beginnt direkt kaudal von LWK5 und geht ca. 3 cm nach kranial. Die Signale am Detektor werden durch einen A/D-Wandler digitalisiert und an den Computer zur Weiterverarbeitung übermittelt. Der Quotient aus dem gemessenen Mineralgehalt (BMC) und der Aufsichtsfläche der Wirbelkörper (Area) ergibt die Mineralfächendichte (BMD). Dafür wurde die interessierende Region (ROI = region of interest) manuell über beweglich Vierecke eingestellt. Eingegrenzt und ausgewertet wurden die beiden Wirbelkörper LWK5 und LWK4. In die jeweilig ROI war der Processus spinosus mit eingeschlossen.

## 2.5 Tötung der Tiere

36 Wochen nach Ankunft der Tiere in der Zentralen Forschungseinrichtung Frankfurt/M. erfolgte deren Tötung durch CO<sub>2</sub>-Intoxikation in einer Box. Anschließend wurde den Ratten mit einer Schere der Thorax unterhalb des Rippenbogens eröffnet, wodurch es zum Pneumothorax kam. Die toten Tiere wurden sofort in Plastiktüten verpackt bei -18°C eingefroren und 3 Wochen später aufgetaut und seziiert. Entnommen worden sind jeweils beide Femora sowie LWK 5. Nach der sorgfältiger Abpräparation des Weichteilgewebes wurden die Knochen mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl) 0,9% (Berlin-Chemie AG) befeuchtet, separat in ebenfalls mit NaCl-getränkte Mullkompressen gewickelt, in gekennzeichnete Plastikbeutel eingepackt und anschließend erneut bei -18°C tiefgefroren.



**Abb. 3** Freilegen der Wirbelsäule



**Abb. 4** Freipräparierte Femora

## 2.6 Auswertungsverfahren: pQCT, $\mu$ CT und biomechanische Tests der Femora

Die nun folgenden Tests wurden von unserer Arbeitsgruppe im April 2003 unter Anleitung wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Ulm durchgeführt.

### 2.6.1 Allgemeine Vorbereitung

Mit Hilfe einer Schiebelehre wurde die Länge der Femora sowie deren Durchmesser in Schaftmitte ermittelt. Dazu wurde der Femur proximal zwischen Femurhals und Trochanter major und distal zwischen den Femorkondylen eingespannt und die Länge abgelesen. In der Hälfte dieser Strecke wurde eine Bleistiftmarkierung angebracht und der Durchmesser an

dieser in mediolateraler Richtung bestimmt. Diese Markierung ist für die nun folgenden Tests von Bedeutung.

### **2.6.2 Mikrocomputertomographie ( $\mu$ -CT)**

Das  $\mu$ CT kann als Weiterentwicklung der in der Klinik bereits etablierten hochauflösenden Computertomographie (CT) betrachtet werden.

Mit dem  $\mu$ -CT wurde in unserem Versuch die Knochenmineraldichte (BMD) ermittelt.

Wir verwendeten das Gerät Fan-Beam- $\mu$ -Scope (Fa. Stratec, Pforzheim, Germany) mit der Software analySIS® (Fa. Soft Imaging Systems, Münster, Germany).

#### **2.6.2.1 Vorbereitung**

Für die Messung wurde der distale Femur so mit Hilfe von Knetmasse aufrechtstehend in einem Eppendorfcup fixiert, dass die oben erwähnte Markierung knapp über dem Gefäßrand zu liegen kommt. Der Knochen muß zentral eingesetzt werden, sodass weder der Femurkopf noch der Trochanter major seitlich über den Rand des Gefäßes hinausragt. Der Eppendorfcup wird nun in ein extra gefertigtes Plexiglasröhrchen eingesetzt und in der Halterung im  $\mu$ -CT befestigt. Dabei sollte bei der Positionierung darauf geachtet werden, dass der Femurhals orthogonal zur Strahlenrichtung steht.

#### **2.6.2.2 Messung und Auswertung**

Zunächst wurde ein Übersichtsscan des gesamten Femur angefertigt. Anhand dieser Aufnahme wurden nun 3 Schnittebenen im Abstand von 0,150 mm in die Mitte des Femurhalses gelegt sowie eine Schnittebene knapp oberhalb des sichtbaren Eppendorfgefäßes platziert. Dieser letzte Schnitt fällt mit der Bleistiftmarkierung in Schaftmitte zusammen. Nun wurde die Messung der 4 Schnitte gestartet.

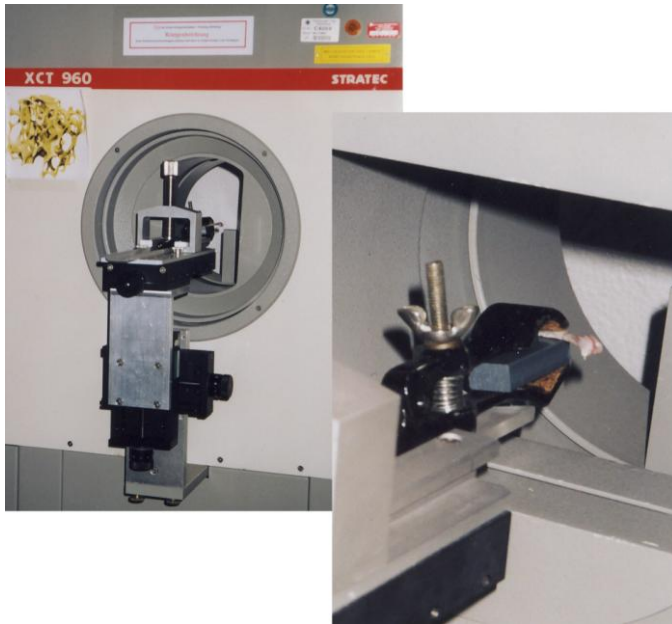
Die entstandenen Bilder wurden automatisch durch das Bildverarbeitungsprogramm analySIS® (Firma Soft Imaging Systems, Münster) aufgearbeitet. Die Scans analysierten die BMD.

### **2.6.3 Periphere Quantitative Computertomographie (pQCT)**

Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um den peripheren CT-Scanner XCT 960 (Fa. Stratec, Pforzheim, Germany) mit der dazugehörigen Mess- und Auswertungssoftware.

### 2.6.3.1 Vorbereitung

Vor Beginn der Messungen wurde täglich ein Standardphantom aus Hydroxylapatit gescannt. Zur Messung der Schaftmitte wurde das Biopat mit der distalen Seite in einen Greifarm eingespannt, sodass es auf seiner Kranialseite zu liegen kommt.



**Abb. 5** pQCT XCT 960 (Stratec) mit zur Messung der Diaphysen der Rattenfemora eingebauter Haltevorrichtung (Greifarm).

Der Greifarm wird nun auf einer Plexiglasschiene am pQCT angebracht und nachdem das Gerät in Nullposition gefahren ist, so ausgerichtet, dass sich der Lichtpunkt auf der Diaphysenmarkierung befindet.

Zur Messung des Femurhalses wurde der Knochen mit seiner distalen Seite derart schräg im Greifarm befestigt, dass er ebenfalls mit seiner Kranialseite zu liegen kommt und der Femurhals orthogonal zur Haltevorrichtung steht. Diese wird nach Einstellen der Nullposition wiederum so auf der Schiene festgestellt, dass die Lichtmarkierung am Femurhals zu sehen ist.

### 2.6.3.2 Messung und Auswertung

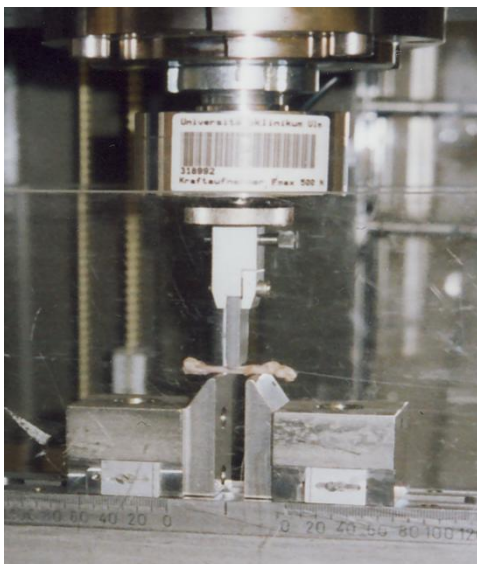
Zur Messung des Femurhalses wurde zwecks der Ermittlung der genauen Messposition ein „scoutview“ aufgenommen, in den manuell die Messlinie gelegt werden konnte. Anschließend wurden -ebenso bei der Diaphysenmessung- 15 Schnitte pro Markierung gescannt. Die entstandenen Bilder wurden automatisch durch das Bildverarbeitungsprogramm

aufgearbeitet. Die Scans analysierten die BMD (bone mineral density). Die Messung der Knochendichte erfolgt durch ROI-Auswertungen im spongiösen Bereich und Umrechnung der CT-Werte mittels eines Kalibrierphantoms in Mineraleichtewerte.

## **2.6.4 Dreipunkt-Biegetest in Schaftmitte der Diaphysen der Femora**

### **2.6.4.1 Durchführung und Auswertung**

Alle linken Femora wurden einer uniaxialen 3-Punkt-Biegung unterzogen. Dafür wurde die Materialprüfmaschine Typ Z010 der Firma Zwick mit dem zugehörigen Programm testXpert verwendet. Die Maschine wird einmal im Jahr durch die Firma Zwick kalibriert. In die Kalibrierung eingeschlossen sind alle verwendeten Längenänderungsaufnehmer und Kraftdosenmesser.

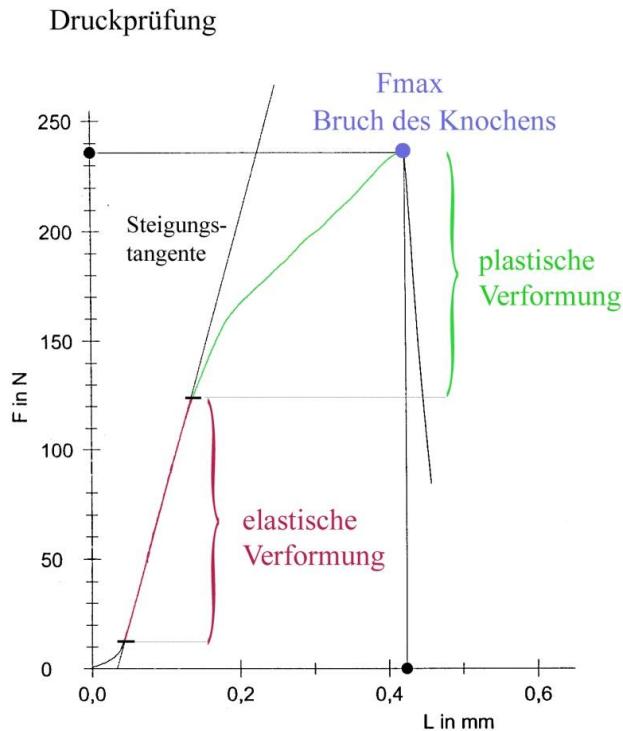


**Abb. 6** Platzierung des Femurs in der Materialprüfmaschine Typ Z010 Firma Zwick zum 3-Punkt-Biegungs-Test

Der Femur wurde derart in die Halterung des Gerätes eingelegt, dass seine anteriore Seite als Auflagefläche diente. Die Stützweite betrug 12 mm. Der Stempel, der die Druckkraft auf das Bioprat ausüben soll, wird nun manuell auf die oben bereits mehrfach erwähnte Markierung in Schaftmitte herangeführt, ohne jedoch Kraft wirken zu lassen.

Nach allen erfolgten Voreinstellungen startet das Programm die Belastung automatisch. Dabei wird zunächst eine Vorkraft von 0,5N mit einer Vorkraftgeschwindigkeit von 1mm/min aufgebaut, die Prüfgeschwindigkeit lag bei 1mm/min, die obere Kraftgrenze war mit 450 N angesetzt. Die Druckprüfung mit kontinuierlich steigender Kraft wurde solange fortgesetzt,

bis es zum Bruch des Knochens kam. Dabei erhielt man den in Abb. 7 dargestellten Kurvenverlauf.



**Abb. 7** Beispiel eines typischen Kurvenverlauf der Druckprüfungen am Tiermodell Ratte, sowohl beim Dreipunktbiegetest im Bereich der Diaphysen der Femora als auch im Bereich der Schenkelhalse der Femora; F = Kraft (N); L= Länge (mm); Fmax = maximale Kraft bis zum Bruch des Knochens

Der nicht-lineare Anteil der Kraft-Verformungskurve zu Beginn der Messungen kommt dadurch zustande, dass am Anfang noch keine gleichmäßige Belastung besteht, sondern die peripheren Anteile des Knochens stärker belastet werden als die zentralen (Cook und Larke 1945). Für die Auswertung mit dem Programm testXpert wurde an jede Messkurve die Steilheit der Kurve durch das Anlegen einer Tangente in den Bereich der elastischen Veränderung ermittelt. Je steiler der Tangentenverlauf, desto elastischer ist der Knochen.

## 2.6.5 Druckprüfung am Hüftkopf/ Schenkelhals der Femora

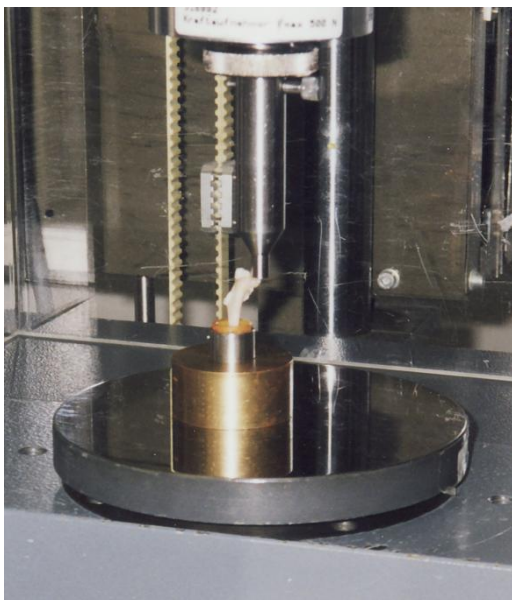
### 2.6.5.1 Vorbereitung

Um die Druckprüfung am Femurkopf durchführen zu können, war es nötig, alle rechten Femora in Eppendorf-Gefäße einzubetten. Dazu wurde ein schnellhärtender, kaltpolymerisierender Kunststoff auf Basis von Methylmethacrylat in Form eines Gemisches

von Pulver und Flüssigkeit (Technovit 3040; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG; Wehrheim) verwendet. Die distalen Abschnitte der Knochen wurden derart in die mit dem eben genannten Gemisch gefüllten Eppendorfcups eingesetzt, dass der Schaft genau orthogonal zum Rand des Gefäßes steht und die Markierung der Schaftmitte genau mit diesem abschließt. Nach der Aushärtung wurde mit Hilfe einer Kreissäge das kaudale Ende der Eppendorfcups entfernt, um diese an die Haltevorrichtung des Druckprüfgerätes anzupassen.

### 2.6.5.2 Durchführung und Auswertung

Hierfür wurde ebenfalls die Materialprüfmaschine Typ Z010 der Firma Zwick mit dem Programm testXpert benutzt.



**Abb. 8** zeigt die Positionierung eines Rattenfemurs zur Durchführung der Druckprüfung am Hüftkopf mit der Materialprüfmaschine Typ Z010 Fa. Zwick

Die eingebettete Probe wurde in den zylindrischen Teflonröhrchen, die als Haltevorrichtung dienten, befestigt und der Stempel wiederum ohne Kraftausübung manuell so an das Präparat herangeführt, dass dieser unmittelbar auf dem Femurkopf zu liegen kam.

Die Proben wurden mit einer Vorkraft von 1N und einer Geschwindigkeit von 1mm/min vorbelastet. Die Steigerung der Kraft fand mit einer Prüfgeschwindigkeit von 1mm/min statt, die obere Kraftgrenze war mit 450N festgelegt. Der Kraftanstieg wurde solange durchgeführt, bis es zum Bruch des Knochens im Bereich des Schenkelhalses kam. Nach automatischem Stop des Messvorganges nach dem Knochenbruch erhielt man



ebenfalls einen Kurvenverlauf wie bei der Dreipunktbiegung der Diaphysen (s. Abb. 7), in welchem die elastische und die plastische Formveränderung des Knochens bis zum Knochenbruch bei  $F_{max}$  zu sehen war.

Für die Auswertung wurde mit dem Programm testXpert eine Tangente an jede der Messkurven im Bereich der elastischen Verformung angelegt.

## **2.7 $\mu$ CT und Kompressionstest der Lendenwirbelkörper**

Die nun folgenden Tests wurden durch unsere Betreuerin Frau Dr. med. Anja Müller sowie 2 Doktoranden unserer Arbeitsgruppe 9/2003 am OHSU („Oregon Health Sciences University“), Portland/Oregon (USA) durchgeführt.

### **2.7.1 Vorbereitung**

Vor Durchführung der  $\mu$ CT-Scans sowie der Wirbelkörperkompressionstests wurden die tiefgefrorenen Präparate zunächst aufgetaut und zur Schaffung planer Oberflächen die Grund- und Deckplatten der LWK 5 aller Tiere mittels einer Diamant-Säge Typ Isomet 1000 der Firma Buehler entfernt.

### **2.7.2 $\mu$ CT der LWK 5**

Die Scans wurden am Gerät „Skyscan- portable x-ray tomograph“  $\mu$ CT-40; Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland und der zugehörigen Software Skyscan 1074 durchgeführt. Pro Wirbelkörper wurden 6 Schnittebenen in horizontaler Anordnung im Abstand von  $20\mu\text{m}$  gelegt und gemessen. Nach der Analyse der 6 Schnittebenen wurde ein Durchschnittswert der BMD ermittelt.

### **2.7.3 Wirbelkörperkompressionstests der LWK 5**

Die Messungen wurden mit dem Gerät Isomet 1000 (Fa. Buehler, Germany) sowie zugehöriger Software „Instrom 4442“ durchgeführt. Dazu war es nötig, die Länge der Wirbelkörper auszumessen. Die Wirbelkörper wurden derart in das Gerät eingespannt, dass Kraft von oben und unten auf die abgesägten planer Grund- und Deckplatten mit einer konstanten Vorschubkraft wirkte. Die Vorschubrate der Messeinrichtung betrug  $1,5\text{ mm/min}$  bei einer Maximalkraft von  $500\text{N}$ . Die Validierungsfeder des Gerätes war auf  $3,01\text{ N/mm}$  geeicht. Ermittelt wurden die Maximalkraft  $F_{max}$  bis zur Kompression des Wirbelkörpers sowie die Steigung als Ausdruck der Elastizität.



## **2.8 Statistische Auswertung**

Die Signifikanztests sowie graphischen Darstellungen wurden mit dem Programm BiAS 8.2-2006 (Biometrische Analyse von Stichproben) mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Hanns Ackermann, Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt, erstellt. Zunächst wurden alle Werte auf Gaußverteilung geprüft (Kolmogoroff-Smirnoff-Lilliefors-Test). Es wurden alle ermittelten Werte einbezogen. Da der Großteil der Werte keiner Gaußverteilung folgte, wurde der Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test zur Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse gewählt und statt der Mittelwerte mit dem Median gearbeitet. Insgesamt waren jeweils 10 Gruppenvergleiche möglich. Die graphischen Darstellungen erfolgten mit Boxplots unter Angabe von Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil) und Maximum. Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

### 3 Ergebnisse

Die Betrachtung der Ergebnisse erfolgt jeweils anhand von den unten aufgeführten konkreten 3 Fragestellungen.

#### 3.1 Knochendichtemessungen

Zur Bestimmung der Knochendichte wurden 3 unterschiedliche Verfahren im Bereich der Wirbelkörper sowie Femora der Ratten durchgeführt. Dies waren die duale x-ray Computertomographie (=DXA), die periphere quantitative Computertomographie (=pQCT) sowie die Mikro-Computertomographie (=μCT).

Die Knochendichtemessungen im Bereich der Diaphysen der Femora waren in allen angewendeten Messverfahren mit maximal 2% Unterschied so geringfügig, dass diese Ergebnisse hier nicht betrachtet werden sollen. Diese können im Anhang Abb.32-35 sowie Tab. 40-47 eingesehen werden.

**Zu Fragestellung 1:** Führt die Ovariectomie am Modell der Ratte zu einer Minderung der Knochenmineraldichte und/oder zu einer Minderung der biomechanischen Eigenschaften?

Zur Beantwortung dieser Frage muss man die Ergebnisse der Kontrollgruppe (Scheinovarektomie+Placebo) mit der Gruppe OVX+Placebo vergleichen. In allen 5 DXA-Messungen waren die prozentualen Knochendichteunterschiede der Kontrollgruppe (Sham +Placebo) im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Placebo bzw. Taxotere signifikant mit  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test) zwischen 16,84-21,24% höher (siehe Tab. 3a, 5a, 7a, 9a, 11a sowie Abb. 9-14). Auch die Messung der medianen BMD im Bereich des Lendenwirbelkörpers 5 mittels μCT ergab einen 21,9% signifikant ( $< 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) höheren Wert der Kontrollgruppe im Vergleich zur OVX+Placebo-Gruppe (siehe Abb. 16 sowie Tab. 13a). Im pQCT lag im Bereich der Schenkelhäse der Femora die mediane BMD der Kontrollgruppe im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Placebo in 3 von 4 Messungen signifikant ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) höher, und zwar für BMDgesamt 2,92-6,17% (siehe Tab. 15a, 17a, Abb. 17, 18) und für die trabekuläre BMD 14,91-15,73% (siehe Tab. 19a, 21a, Abb. 19, 20).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch im μCT. Im Bereich der Hüftköpfe/ Schenkelhäse der Femora war die mediane BMD der Kontrollgruppe im Vergleich zu den ovariectomierten

Tieren mit Placebo stets signifikant ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) höher zwischen 7,21-9,52% (siehe Abb. 21-24, Tab. 23a, 25a, 27a, 29a).

**Zu Fragestellung 2:** Hat das Chemotherapeutikum Docetaxel auch einen direkten Einfluss auf den Knochen hinsichtlich Knochendichte und biomechanische Eigenschaften?

Zur Beantwortung dieser Frage muss man sich die Ergebnisse der beiden Gruppen OVX+Placebo vs OVX+Taxotere® (Docetaxel) betrachten.

In allen 5 DXA-Messungen gab es zwischen den Gruppen OVX+Placebo und OVX+Tax zwar prozentuale Unterschiede, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant. Prozentual unterschieden sich die medianen BMD der beiden Gruppen folgendermaßen: 1. DXA: 4,43% 2. DXA: -8,06% 3. DXA: 2,25% 4. DXA: -10,34% 5. DXA: -3,90% ( $p > 0,05$ ) (siehe Abb.9-14, Anhang Tab. 3b, 5b, 7b, 9b, 11b). Das durchgeführte  $\mu$ CT im Bereich von LWK 5 ergab um 9,6% höhere Knochendichtewerte der OVX+Placebo-Gruppe im Vergleich zu OVX+Tax (siehe Tab.13a und Abb. 16). Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test).

Statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) zwischen den beiden Gruppen konnten bei den Messungen im pQCT der BMDgesamt der Schenkelhäse FR (=rechte Femora) mit 6,23% höheren Werten für die OVX+Placebo-Gruppe (siehe Tab. 15a, Abb. 17) sowie bei BMDtrabekulär Schenkelhäse FL(=linke Femora) mit 11,78% höheren Werten für die OVX+Placebo-Gruppe (siehe Tab.21a, Abb. 20) ermittelt werden. Die gleiche Tendenz ergaben sich für den Bereich Schenkelhals FL (=linke Femora) BMD gesamt (4,72%,  $p > 0,05$ ) (siehe Abb. 18, Anhang Tab. 17b) und Schenkelhals FR (=rechte Femora) BMD trabekulär (8,75%,  $p > 0,05$ ) (siehe Abb. 19, Anhang Tab. 19b) mit jeweils höheren Werten für die Gruppe OVX + Placebo (nicht signifikant).

Auch im  $\mu$ CT zeigten sich teilweise signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen und zwar bei den Messungen der Hüftköpfe FR (=rechte Femora) (5,31%,  $p < 0,05$ ) (Abb. 21, Tab. 23a), der Trochanteren/Schenkelhäse FR (=rechte Femora) (4,56%,  $p < 0,05$ ) (Abb.23, Tab.27a). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den Bestimmungen der BMD im Bereich von Hüftkopf FL (=linke Femora) (4,64%,  $p > 0,05$ ) (Abb.22, Anhang Tab. 25b) und Trochanter/Schenkelhals FL (=linke Femora) (3,99%,  $p > 0,05$ ) (Abb.24, Anhang Tab. 29b), wobei auch hier die medianen Absolutwerte der OVX+Placebo-Gruppe höher lagen.

### **Zu Fragestellung 3:**

Kann die gleichzeitige Gabe des Bisphosphonates Ibandronat in der Dosis von 1µg/kg und in der Dosierung von 25µg/kg einem eventuell schädigenden Einfluss von Docetaxel sowie der Ovariectomie auf den Knochen entgegenwirken?

Zunächst wurden die ovariectomierten Ratten, die Ibandronat erhielten, mit den beiden ovariectomierten Gruppen ohne Ibandronatgabe verglichen. Festzustellen ist, dass bei allen 5 DXA-Messungen die Werte der medianen BMD der beiden Ibandronatgruppen im Vergleich zu den OVX+Placebo-/Taxotere-Gruppen stets zwischen 6-26% höher waren. Die ermittelten prozentualen Unterschiede waren teilweise statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test; siehe Abb.9-14, Tab. 3a, 5a, 7a, 9a, 11a). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe mit 1µg/kg Ibandronat bzw. 25 µg/kg Ibandronat, wobei hier erwähnt sei, dass die Absolutwerte der medianen BMD in 4 der 5 Messungen bei den Tieren mit 25µg/kg 4,33-7,47% höher lagen als bei den Ratten, die 1µg/kg Ibandronat erhielten (siehe Anhang Tab.3b, 5b, 7b, 9b, 11b).

Die Knochendichtewerte der Kontrollgruppe lagen bei der 5. DXA-Messung 9,48% (signifikant mit  $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test; Tab.11a) über dem medianen Wert der Ibandronat 1-Gruppe und 3,73% (nicht-signifikant  $p > 0,05$ ; Anhang Tab.11b) über dem medianen Wert der Ibandronat 25-Gruppe.

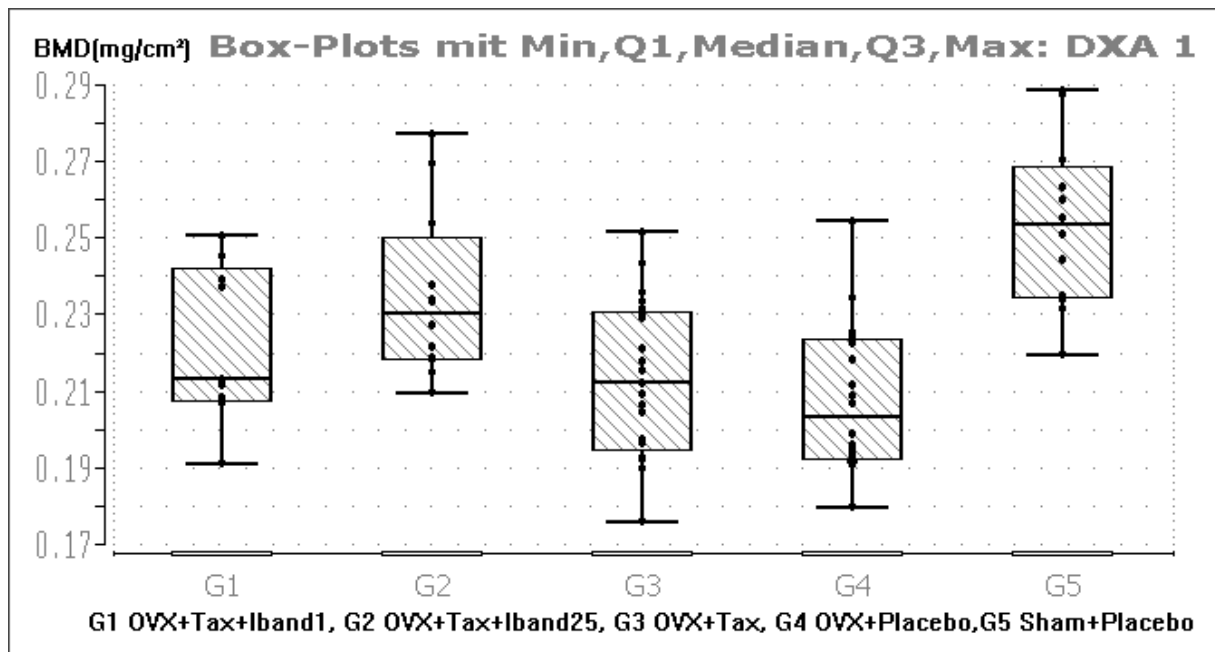
Die mittels µCT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Lendenwirbelkörper 5 zeigte signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; Kruskal Wallis-Test) beider Ibandonatgruppen im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Placebo bzw. Taxotere zwischen 23-41 % (siehe Tab. 13a, Abb. 16):

Die mittels pQCT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMDgesamt im Bereich der Schenkelhälfte der Femora der beiden Ibandronatgruppen vs der beiden Gruppen OVX+Placebo/Tax waren nur teilweise signifikant. Tendenziell hatten die Ibandronatgruppen höhere Knochendichtewerte (ca. 0,05-8,89%) als die beiden Vergleichsgruppen (s. Abb. 17, 18; Tab. 15a, 17a sowie Anhang Tab. 15b und 17b). Die mittels pQCT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMDtrabekulär im Bereich der Schenkelhälfte der Femora der beiden Ibandronatgruppen vs der beiden Gruppen OVX+Placebo/Tax waren nur teilweise signifikant. Tendenziell hatten die Ibandronatgruppen höhere Knochendichtewerte (ca. 2,76-21,21%) als die beiden Vergleichsgruppen (siehe Abb.19, 20; Tab. 19a, 21a sowie Anhang Tab. 19b, 20b).

Die mittels  $\mu$ CT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Hüftköpfe der Femora der Ibandronat 25-Gruppe vs der Gruppe OVX+Tax betragen zwischen 8,44-9,37% und waren statistisch signifikant höher ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test, Abb. 21, 22, Tab. 23a, 25a). Die Werte der beiden Ibandronatgruppen unterscheiden sich nicht-signifikant zwischen 3,72-3,96% mit höheren Werten für die Ibandronat 25-Gruppe (siehe Anhang Tab.23b, 25b). Die Absolutwerte der medianen BMD der Kontrollgruppe (Sham + Placebo) liegen verglichen mit der Ibandronat 1-Gruppe signifikant 7,86-8,89% höher (Tab.23a, 25a). Im Vergleich zur Ibandronat 25-Gruppe zeigte die Kontrollgruppe nicht-signifikant 4,06-5,46% höhere Werte (Anhang Tab. 23b, 25b).

Die mittels  $\mu$ CT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Troch./Schenkelhalse der Femora der Ibandronat 25-Gruppe vs der Gruppe OVX+Tax betragen zwischen 8,7-9,42% und waren statistisch signifikant höher (Abb. 23, 24, Tab. 27a, 29a). Die Ibandronat 1-Gruppe vs OVX+Tax zeigte teilweise signifikante Ergebnisse mit 5,91-6,77% höheren Werten (Tab. 27a, 29a und Anhang Tab. 27b, 29b). Der Vergleich der beiden Ibandronatgruppen mit der OVX+Placebo-Gruppe brachte nicht-signifikant höhere Werte zwischen 1,07-4,42% (Anhang Tab. 27b, 29b).

## 1. DXA-Messung Gruppen 1-5



**Abbildung 9:** 1. Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) vor Therapiebeginn an LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 von Ratten; OVX=Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	G1	G2	G3	G4	G5
	OVX+Tax+	OVX+Tax+	OVX+Tax	OVX+Placebo	Sham+
DXA 1	Iband 1	Iband25			Placebo
Median	0,2133	0,2304	0,212	0,2030	0,2532
Mittelwert	0,2227	0,2348	0,2133	0,2078	0,2534
Max	0,2506	0,2771	0,2518	0,2545	0,2884
Min	0,1913	0,21	0,1763	0,17985	0,2198

Tab.2 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5: DXA 1 vor Therapiebeginn; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie

OVX+Placebo	vs	Sham + Placebo	-19,86%	p= 0,000036
OVX+Tax	vs	Sham + Placebo	-16,30%	p= 0,000462
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	13,50%	p= 0,026387

Tab. 3a Signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 1 vor Therapiebeginn; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 3b)

## 2. DXA-Messung

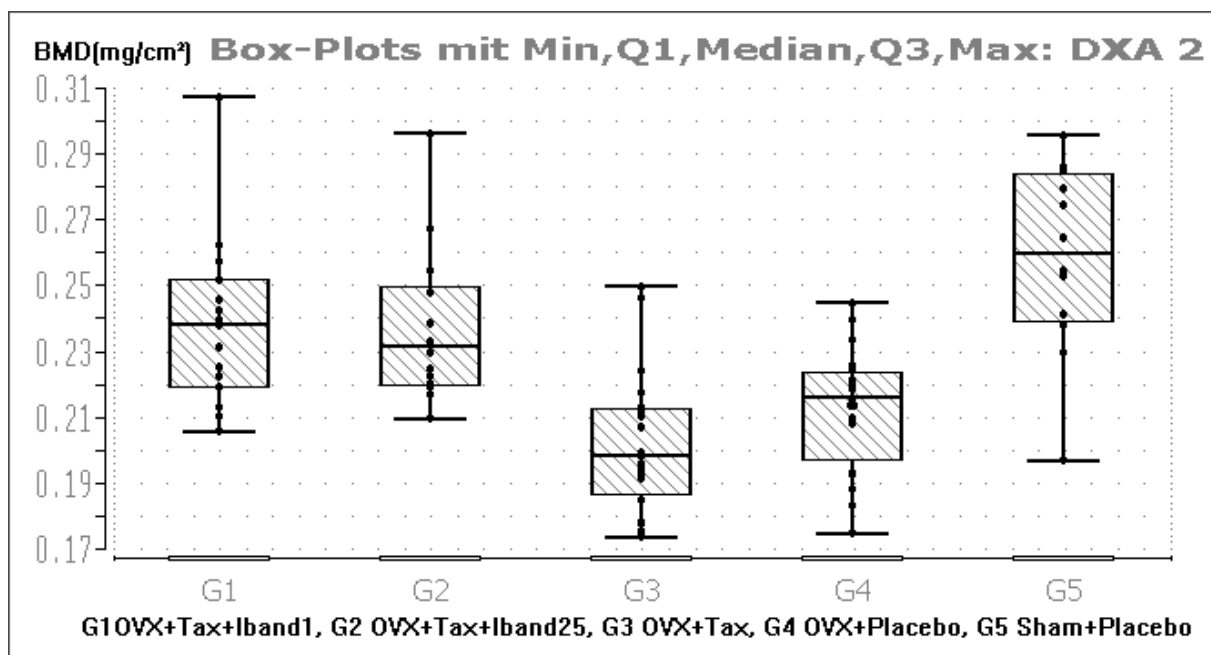


Abbildung 10: 2. Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) nach 3 Zyklen Taxotere an LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	G1 OVX+Tax+ Iband 1	G2 OVX+Tax+ Iband25	G3 OVX+Tax	G4 OVX+ Placebo	G5 Sham+ Placebo
DXA 2					
Median	0,2383	0,2315	0,1984	0,2158	0,2595
Mittelwert	0,2382	0,2367	0,2021	0,2130	0,2582
Max	0,3072	0,2961	0,2500	0,2448	0,2958
Min	0,2062	0,2097	0,1737	0,1752	0,1973

Tab.4 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5: DXA 2 nach 3 Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie

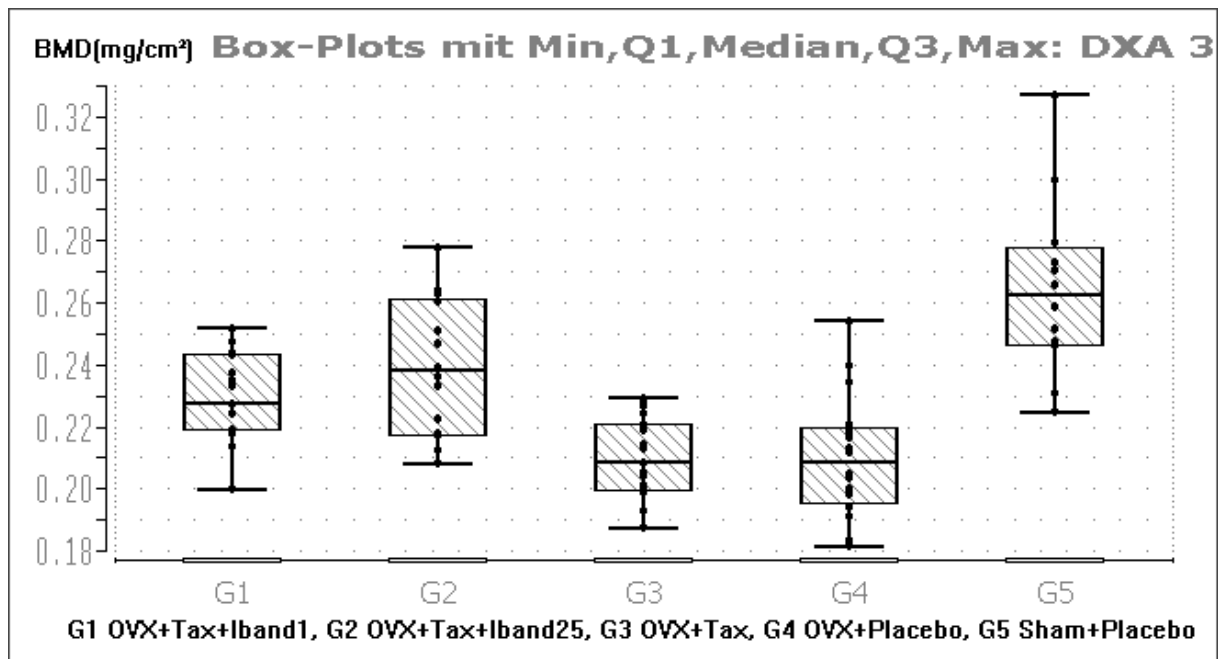
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-23,55%	p= 0,000006
OVX+Placebo	vs	Sham +Placebo	-16,84%	p= 0,000951
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	20,11%	p= 0,001203
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	16,68%	p= 0,001701

Tab. 5a Signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 2 nach 3 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 5b)



### 3. DXA-Messung



**Abbildung 11:** 3. Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) nach 6 Zyklen Taxotere an LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 von Ratten; OVX=Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	G1 OVX+Tax+ Iband 1	G2 OVX+Tax+ Iband25	G3 OVX+Tax	G4 OVX+ Placebo	G5 Sham+ Placebo
Median	0,2277	0,2380	0,2133	0,2086	0,2626
Mittelwert	0,2295	0,2395	0,2082	0,2103	0,2646
Max	0,2519	0,2777	0,2267	0,2539	0,3268
Min	0,2002	0,2083	0,1786	0,1821	0,2250

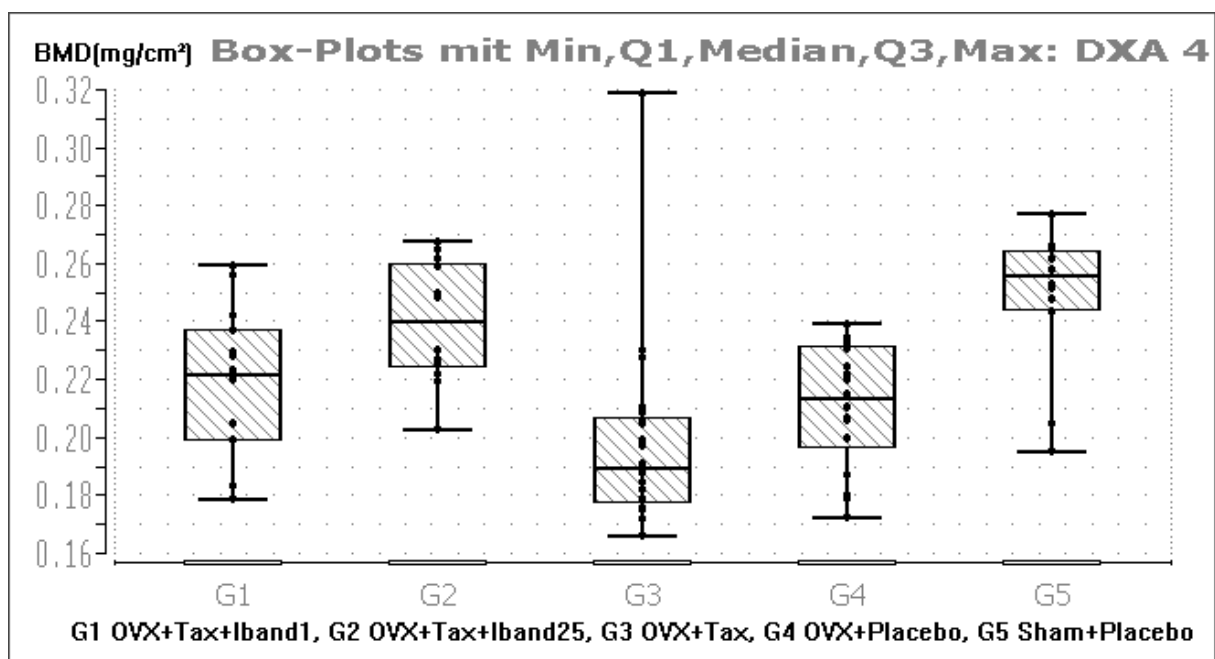
Tab. 6 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5: DXA 3 nach 6 Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie

OVX+Placebo	vs Sham+Placebo	-20,59%	p= 0,000002
OVX+Tax	vs Sham+Placebo	-18,80%	p= 0,000004
OVX+Tax+Iband 25	vs OVX+Placebo	14,09%	p= 0,004376
OVX+Tax+Iband 25	vs OVX+Tax	11,58%	p= 0,005376
OVX+Tax+Iband 1	vs OVX+Placebo	9,16%	p= 0,030776
OVX+Tax+Iband 1	vs OVX+Tax	6,75%	p= 0,034850

Tab. 7a Signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 3 nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 7b)

#### 4.DXA-Messung



**Abbildung 12:** 4. Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) 5 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1 n=15, G2 n=14, G3 n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

DXA 4	G1	G2	G3	G4	G5
	OVX+Tax+ Iband 1	OVX+Tax+ Iband25		OVX+ Placebo	Sham+ Placebo
Median	0,2216	0,2395	0,1891	0,2109	0,2554
Mittelwert	0,2193	0,2395	0,1984	0,2104	0,2484
Max	0,2595	0,2678	0,3190	0,2391	0,2770
Min	0,1790	0,2031	0,1662	0,1727	0,1953

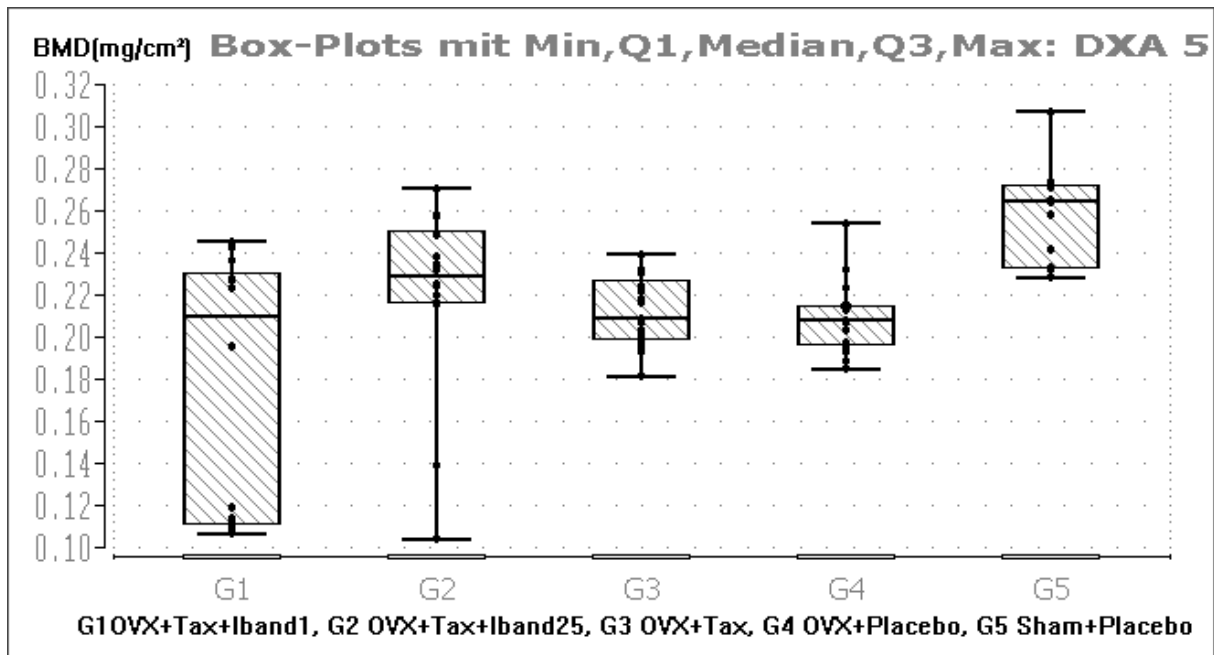
Tab. 8 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5: DXA 4 5 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie

OVX+Tax	vs Sham+Placebo	-25,56%	p= 0,000020
OVX+Tax+Iband 25	vs OVX+Tax	26,65%	p= 0,000182
OVX+Placebo	vs Sham+Placebo	-17,42%	p= 0,013288

Tab. 9a Signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 4 5 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 9b)

## 5.DXA-Messung



**Abbildung 13:** 5. Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

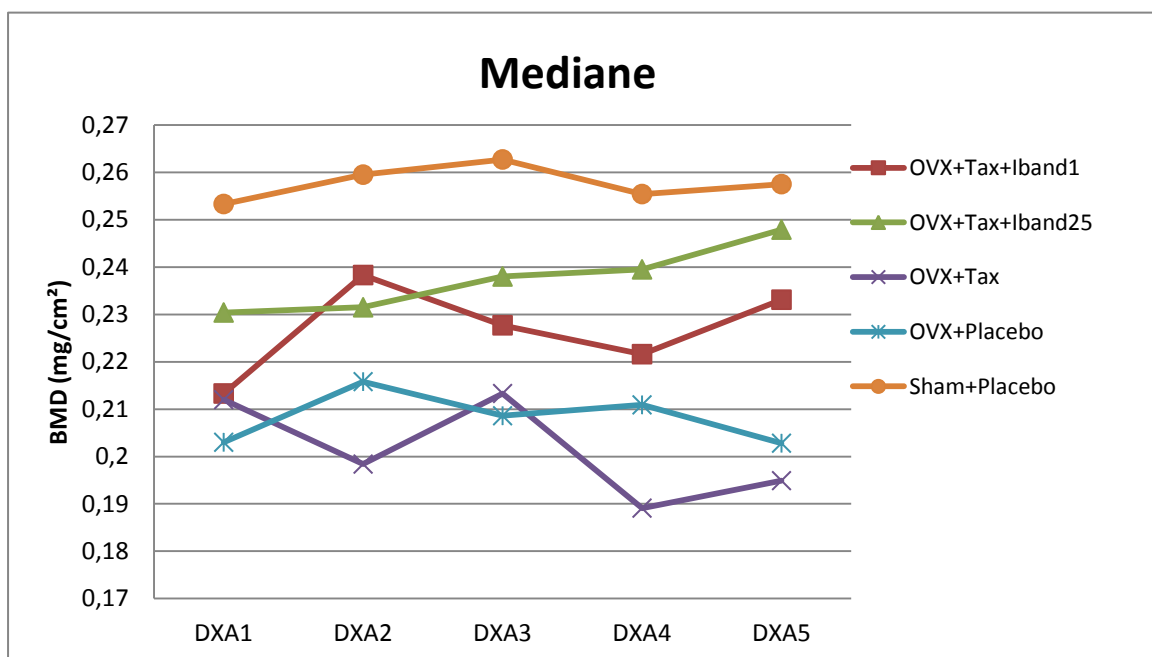
	G1 OVX+Tax+ Iband 1	G2 OVX+Tax+ Iband25	G3 OVX+Tax	G4 OVX+ Placebo	G5 Sham+ Placebo
DXA 5					
Median	0,2331	0,2479	0,1949	0,2028	0,2574
Mittelwert	0,2296	0,2529	0,1960	0,2063	0,2580
Max	0,2590	0,2823	0,2317	0,2546	0,2942
Min	0,1896	0,2201	0,1428	0,1809	0,2170

Tab.10 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (=dual x-ray absorptiometry) an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5: DXA 4 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie

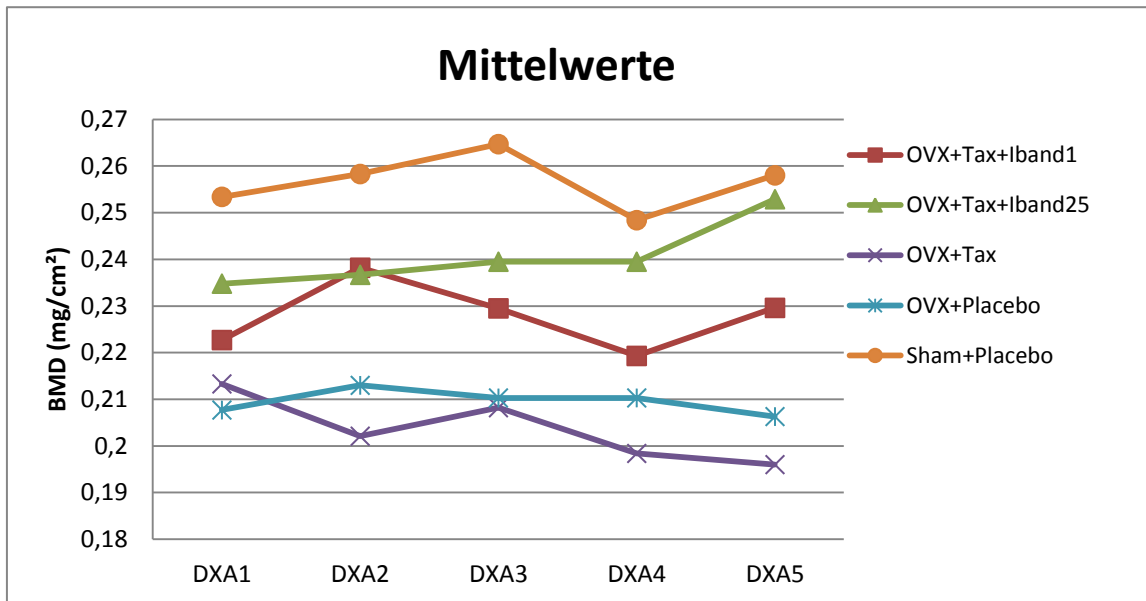
OVX+Placebo	vs Sham+Placebo	-21,24%	p= 0,00032
OVX+Tax+Iband 1	vs Sham+Placebo	-9,48%	p= 0,000247
OVX+Tax	vs Sham+Placebo	-24,31%	p= 0,000278

Tab. 11a Signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 5 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 11b)

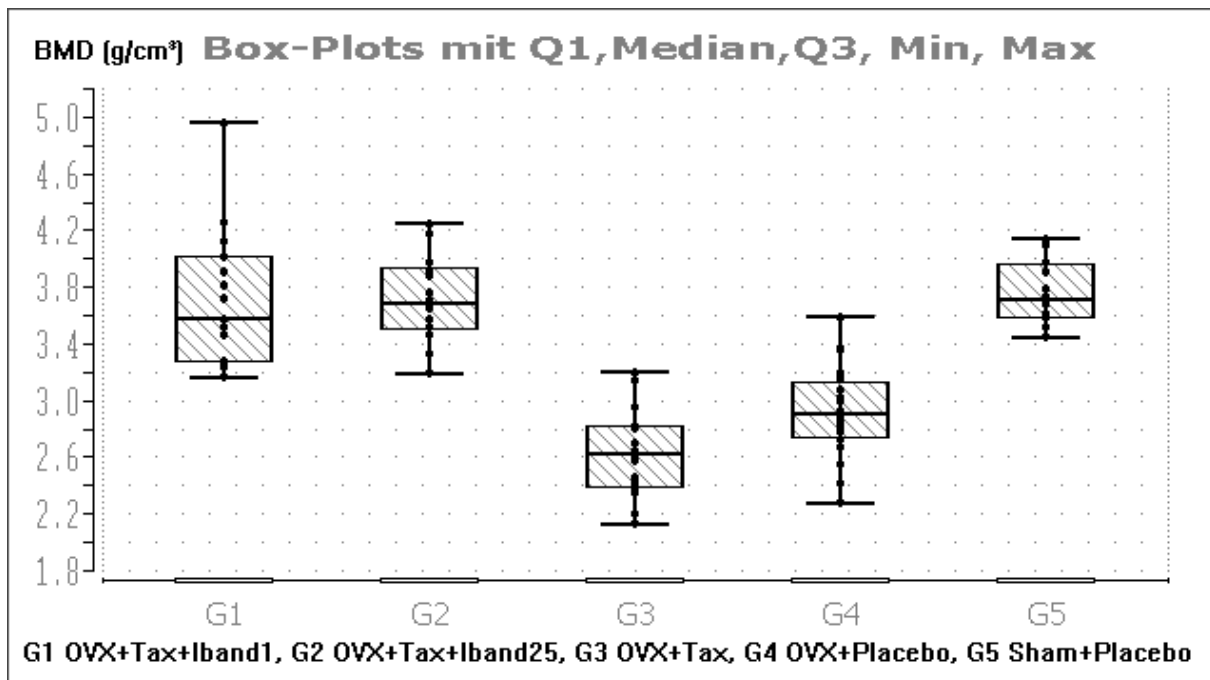


**Abbildung 14:** mediane Knochendichte (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) gemessen an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 im Gruppenvergleich; OVX= Ovarektomie; Tax= Taxotere; Iband= Ibandronat; Sham= Scheinovarektomie; DXA1 vor Therapiebeginn, DXA 2 nach 3 Zyklen Taxotere, DXA 3 nach 6 Zyklen Taxotere, DXA 4 5 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere, DXA 5 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere



**Abbildung 15:** Mittelwerte der Knochendichte (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>2</sup>)) mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) gemessen an Ratten LWK (=Lendenwirbelkörper) 4/5 im Gruppenvergleich; OVX= Ovarektomie; Tax= Taxotere; Iband= Ibandronat; Sham= Scheinovarektomie; DXA1 vor Therapiebeginn, DXA 2 nach 3 Zyklen Taxotere, DXA 3 nach 6 Zyklen Taxotere, DXA 4 5 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere, DXA 5 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere

### μCT LWK 5



**Abbildung 16:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (g/cm<sup>3</sup>) mittels μCT (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am LWK (= Lendenwirbelkörper) von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

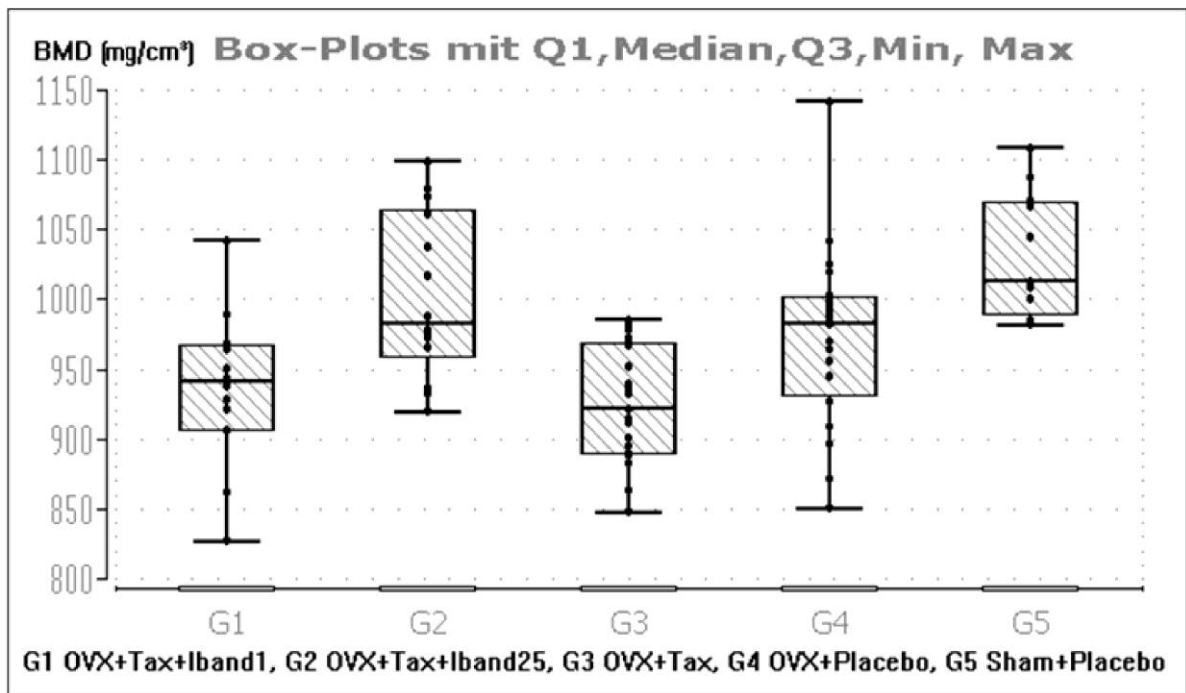
	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	3,5728	3,6830	2,6184	2,8966	3,7086
<b>Mittelwert</b>	3,7220	3,7205	2,6339	2,9175	3,7592
<b>Max</b>	4,9588	4,2492	3,2028	3,5888	4,1404
<b>Min</b>	3,1772	3,2016	2,1424	2,2788	3,4564

Tab. 12 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (g/cm<sup>3</sup>)) mittels µCT (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; LWK (Lendenwirbelkörper) 5: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-29,40%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	40,66%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	36,45%	p= 0,000000
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-21,90%	p= 0,000231
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	27,15%	p= 0,000267
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	23,34%	p= 0,000611

Tab. 13a Signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels µCT (=Mikro-Computertomographie) am Lendenwirbelkörper 5 bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 13b)

pQCT Femora



**Abbildung 17:** Knochendichtemessung BMD gesamt (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

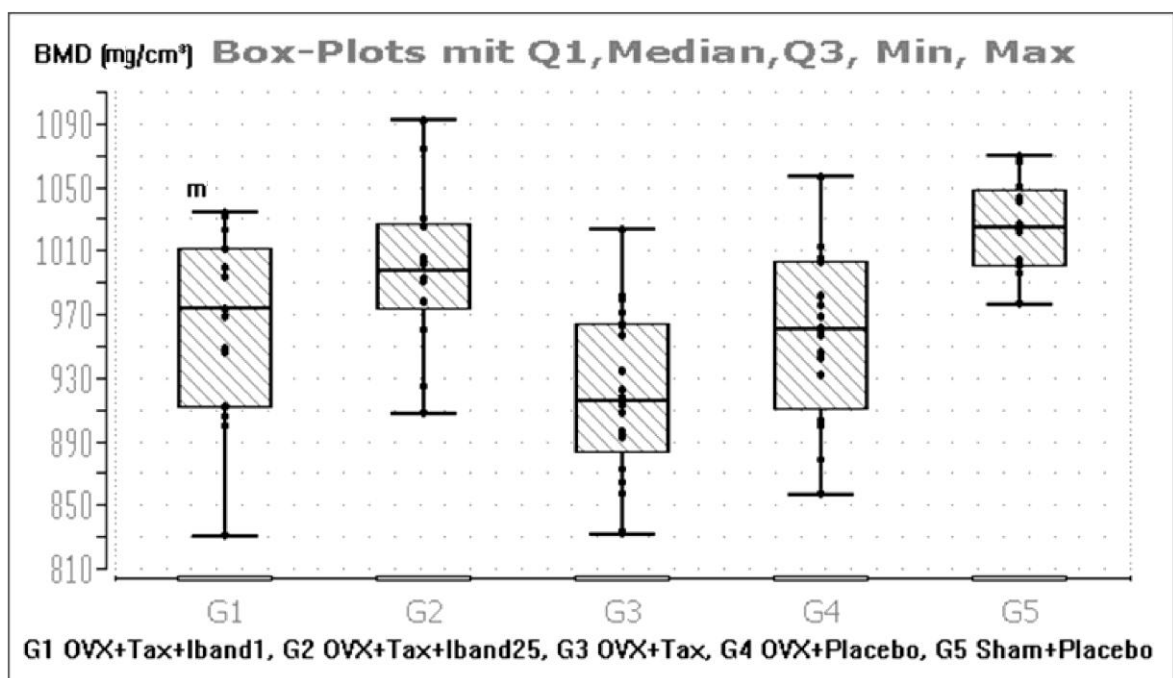
	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband</b> <b>1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband</b> <b>25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham</b> <b>+Placebo</b>
<b>Median</b>	941,3	982,7	921,9	983,15	1012,7
<b>Mittelwert</b>	937,0	1002,93	925,0	973,09	1030,58
<b>Max</b>	1041,9	1099,1	985,1	1142	1108,4
<b>Min</b>	827,4	921	847,8	851,2	983,2

Tab. 14 Absolutwerte Knochenmineraldichte BMD gesamt (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum;



OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-8,97%	p= 0,000011
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-7,05%	p= 0,000764
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	-6,60%	p= 0,003325
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-6,23%	p= 0,044171
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-4,21%	p= 0,050524

Tab. 15a Signifikante prozentuale Unterschiede der gesamten Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 15b)



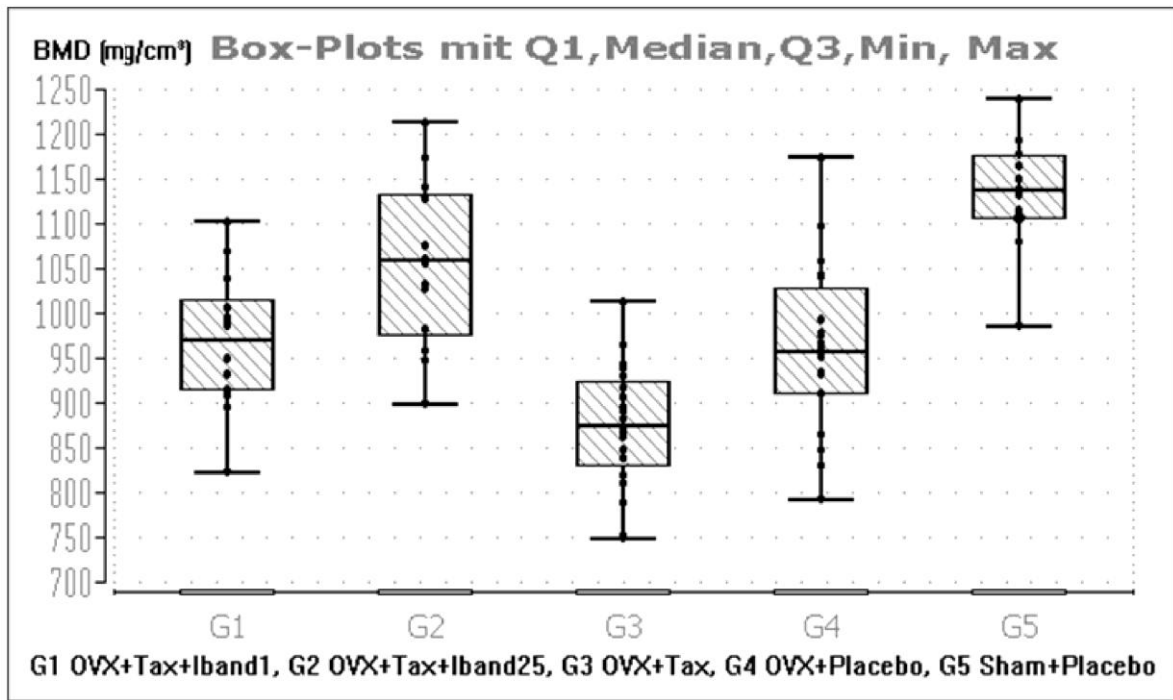
**Abbildung 18:** Knochendichtemessung BMD gesamt (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der linken Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	973,3	997,25	915,8	961,15	1024,35
<b>Mittelwert</b>	963,69	998,61	919,13	957,75	1025,2
<b>Max</b>	1034,4	1092,3	1024,0	1057,0	1070,2
<b>Min</b>	831,7	908,6	832,8	856,9	977,7

Tab.16 Absolutwerte Knochenmineraldichte BMD gesamt (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals linke Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum;

OVX+Tax	vs Sham+Placebo	-10,60%	p= 0,000006
OVX+Tax+Iband 25	vs OVX+Tax	8,89%	p= 0,002029
OVX+Placebo	vs Sham+Placebo	-6,17%	p= 0,007190
OVX+Tax+Iband 1	vs Sham+Placebo	-4,98%	p= 0,039014

Tab. 17a Signifikante prozentuale Unterschiede der gesamten Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 17b)



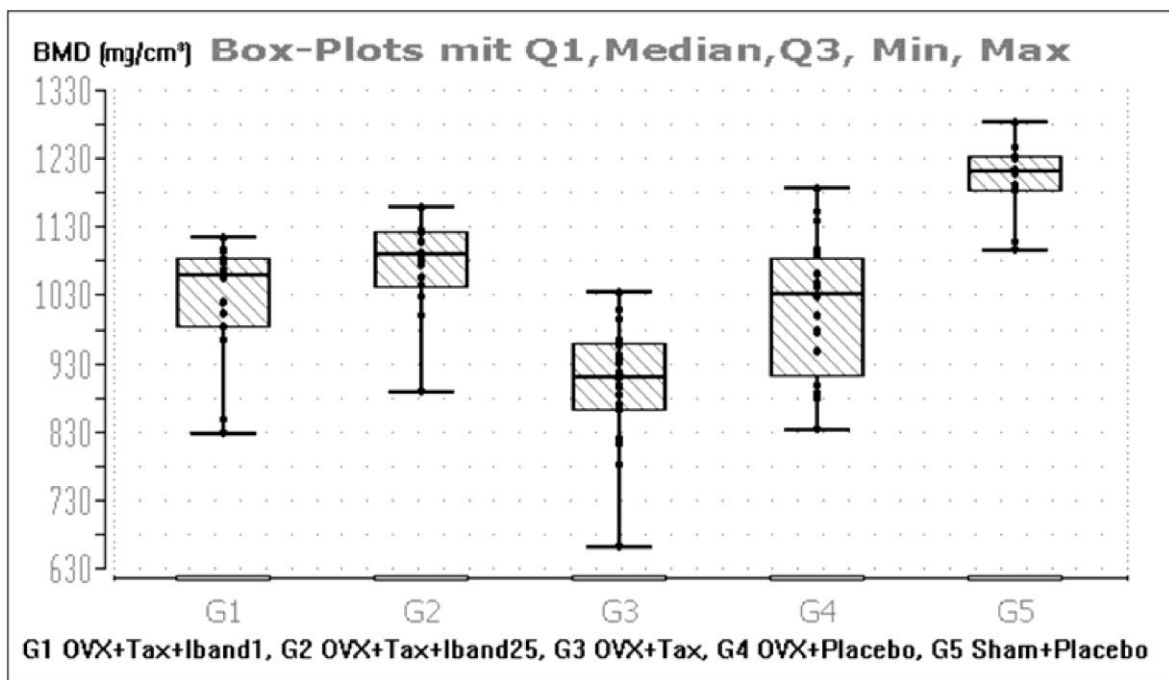
**Abbildung 19:** trabekuläre Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

BMD trabekulär (mg/cm <sup>3</sup> )	G1 OVX+Tax+ Iband 1µg/kg	G2 OVX+Tax+ Iband 25µg/kg	G3 OVX+Tax	G4 OVX+Placebo	G5 Sham+ Placebo
<b>Median</b>	968,65	1058,75	873,5	957,3	1136,05
<b>Mittelwert</b>	967,96	1059,2	874,75	959,1	1132,98
<b>Max</b>	1101,7	1212,9	1014	1174	1238,4
<b>Min</b>	823,3	899	749,6	793,9	987,7

Tab. 18 Absolutwerte trabekuläre Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum;

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-23,11%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	21,21%	p= 0,000021
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-15,73%	p= 0,000987
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-14,74%	p= 0,006480

Tab. 19a Signifikante prozentuale Unterschiede der trabekulären Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 19b)



**Abbildung 20:** trabekuläre Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der linken Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte. trabekuläre BMD (mg/cm<sup>3</sup>)

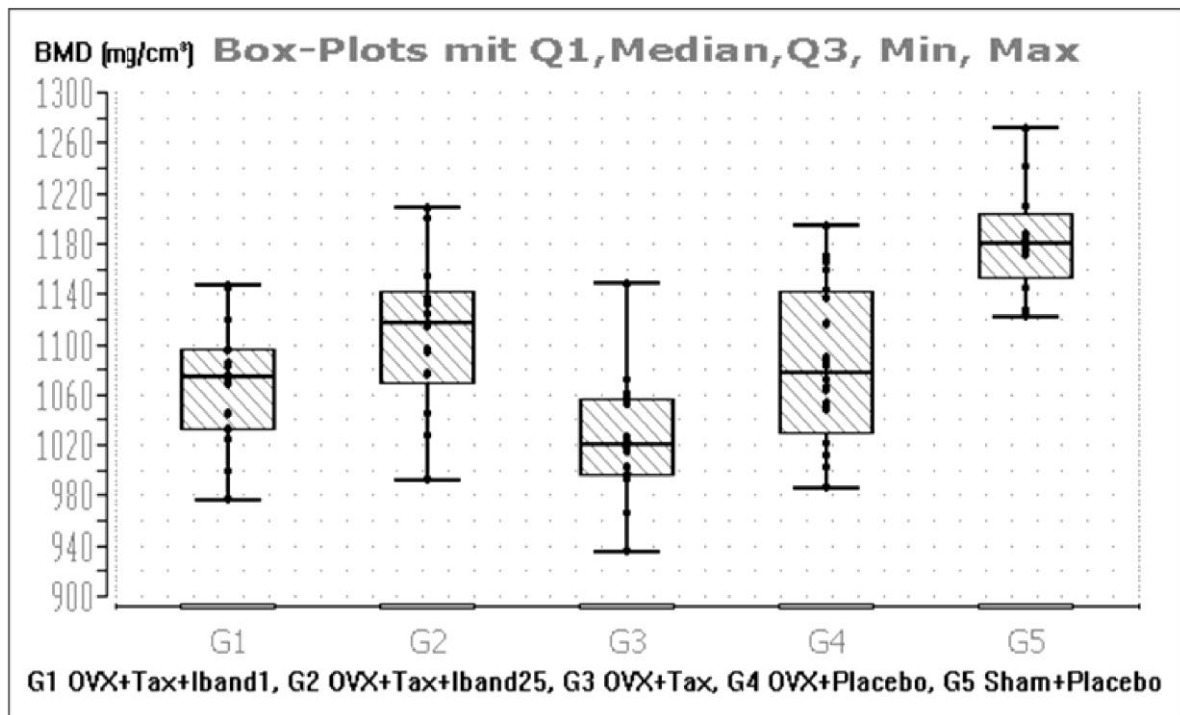
<b>BMD trabekulär (mg/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>G1 OVX+Tax+ Iband 1µg/kg</b>	<b>G2 OVX+Tax+ Iband 25µg/kg</b>	<b>G3 OVX+Tax</b>	<b>G4 OVX+Placebo</b>	<b>G5 Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1059,3	1087,95	909,4	1030,85	1211,45
<b>Mittelwert</b>	1025,69	1072,91	902,07	1011,31	1200,81
<b>Max</b>	1115,1	1157,2	1033,8	1187,1	1282
<b>Min</b>	829,9	890,1	664,4	835,7	1096,4

Tab. 20 Absolutwerte trabekuläre Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals linken Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-24,93%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	19,63%	p= 0,000249
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-14,91%	p= 0,000249
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-12,56%	p= 0,002699
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	16,48%	p= 0,019421
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-11,78%	p= 0,033100

Tab. 21a Signifikante prozentuale Unterschiede der trabekulären Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 21b)

## μCT Femora



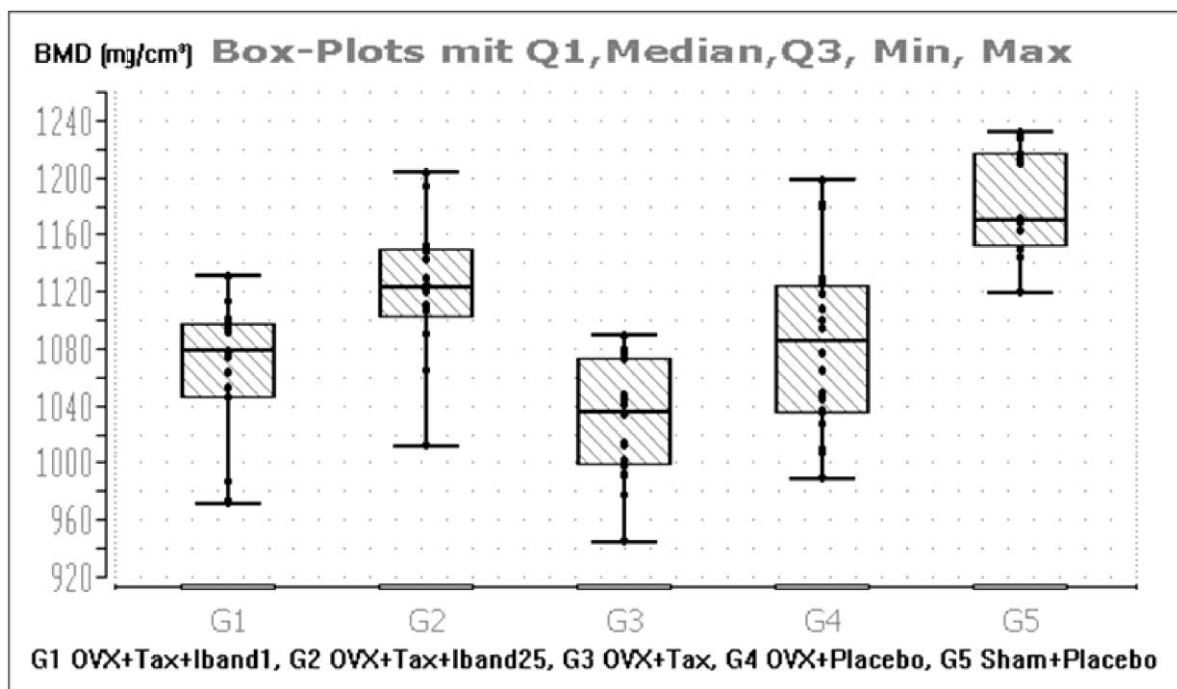
**Abbildung 21:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) mittels  $\mu\text{CT}$  (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Hüftkopf der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.1<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.25<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1074,42	1115,95	1020,31	1077,48	1180,41
<b>Mittelwert</b>	1068,08	1108,99	1024,13	1084,50	1182,93
<b>Max</b>	1147,05	1208,85	1148,87	1194,39	1271,79
<b>Min</b>	978,19	992,65	936,94	986,61	1123,52

Tab. 22 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )) mittels  $\mu\text{CT}$  (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Hüftkopf rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-13,56%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-8,98%	p= 0,001654
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	9,37%	p= 0,002446
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-8,72%	p= 0,003710
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-5,31%	p= 0,031164

Tab. 23a Signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Hüftkopf rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 23b)



**Abbildung 22:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) mittels  $\mu$ CT (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Hüftkopf der linken Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht-gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1078,26	1122,77	1035,39	1085,82	1170,25
<b>Mittelwert</b>	1065,02	1122,95	1031,04	1083,93	1182,40
<b>Max</b>	1131,51	1203,43	1088,73	1198,23	1232,32
<b>Min</b>	972,29	1012,35	946,12	990,02	1120,58

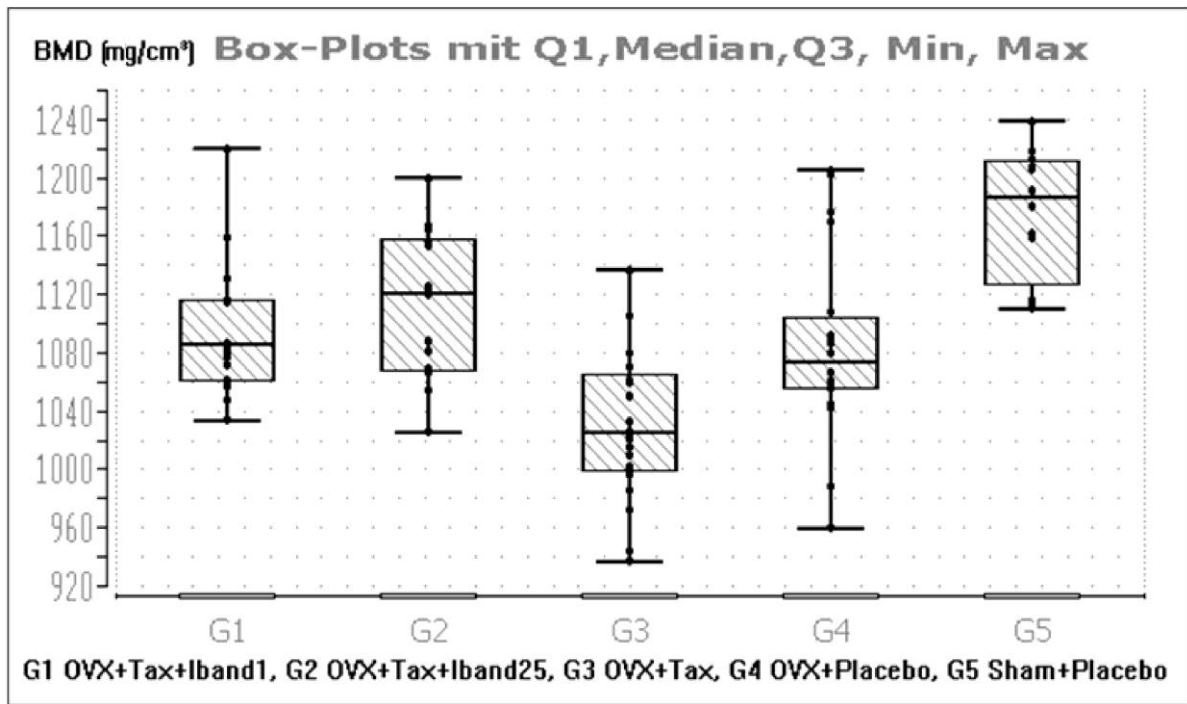
Tab. 24 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels µCT (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Hüftkopf linke Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-11,50%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	8,44%	p= 0,000250
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-7,86%	p= 0,000254
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-7,21%	p= 0,001313

Tab. 25a Signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels µCT (=Mikro-Computertomographie) am Hüftkopf linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 25b)



μCT



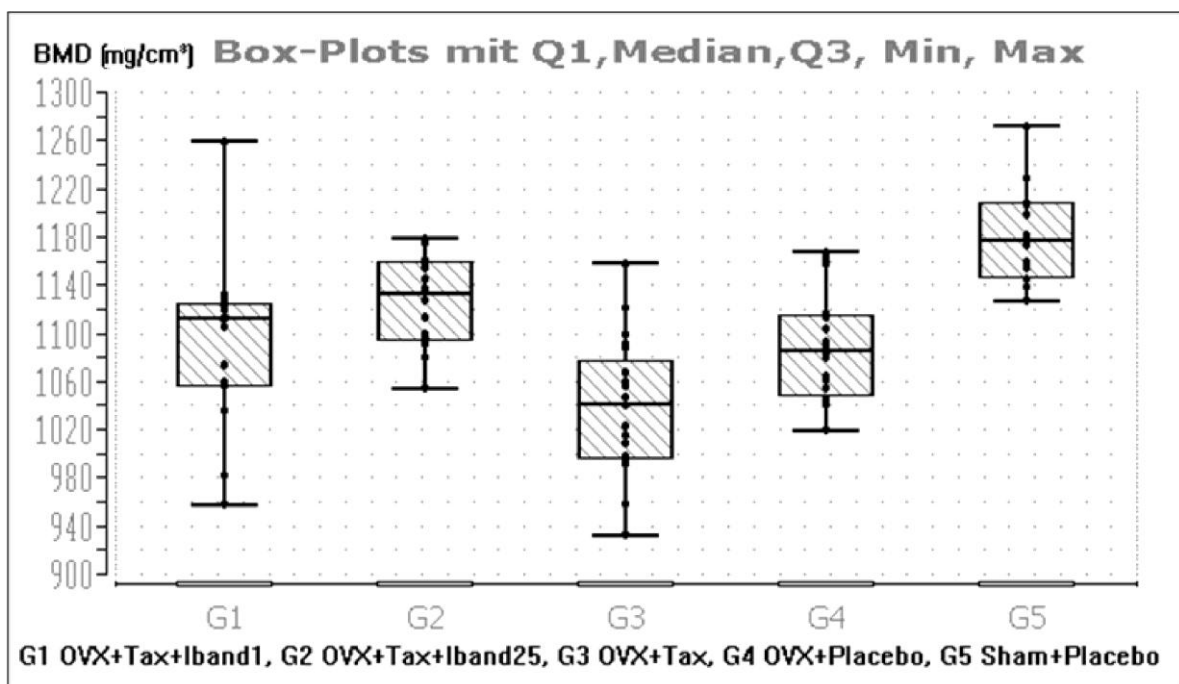
**Abbildung 23:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (μg/cm<sup>3</sup>) mittels μCT (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1μg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25μg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1084,66	1120,62	1024,18	1073,17	1186,02
<b>Mittelwert</b>	1097,31	1113,80	1029,80	1084,65	1176,36
<b>Max</b>	1220,28	1199,13	1137,03	1204,31	1238,43
<b>Min</b>	1034,77	1026,58	936,98	960,61	1110,22

Tab. 26 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels μCT (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs Sham+Placebo	-13,65%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs OVX+Tax	9,42%	p= 0,001614
OVX+Placebo	vs Sham+Placebo	-9,52%	p= 0,003700
OVX+Tax+Iband 1	vs OVX+Tax	5,91%	p= 0,014763
OVX+Tax+Iband 1	vs Sham+Placebo	-8,55%	p= 0,039881
OVX+Tax	vs OVX+Placebo	-4,56%	p= 0,046805

Tab. 27 a Signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 27b)



**Abbildung 24:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) mittels  $\mu$ CT (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere am Schenkelhals der linken Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1111,92	1131,96	1041,40	1084,70	1176,85
<b>Mittelwert</b>	1092,30	1126,36	1040,40	1089,50	1182,80
<b>Max</b>	1258,59	1178,62	1157,76	1166,73	1272,07
<b>Min</b>	958,48	1055,30	933,15	1020,74	1128,21

Tab. 28 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels µCT (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Schenkelhals linke Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-11,51%	p= 0,000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	8,70%	p= 0,000940
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-7,83%	p= 0,001020
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-5,52%	p= 0,004345

Tab. 29a Signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels µCT (=Mikro-Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 29 b)

### **3.2. Biomechanische Tests (Dreipunktbiegetest Diaphysen Femora, Kompressionstest Lendenwirbelkörper 5)**

Es wurden 3 biomechanische Tests durchgeführt: der Dreipunktbiegetest im Bereich der Diaphysen der Rattenfemora, der Kompressionstest im Bereich der Wirbelkörper 5 der Ratten sowie die Druckprüfung im Bereich der Schenkelhäse der Rattenfemora.

Die durchgeführte Druckprüfung im Bereich der Schenkelhäse der Femura der Ratten erbrachte im Gegensatz zu allen anderen Untersuchungsverfahren in keinem der Gruppenvergleiche signifikante Ergebnisse, diese sollen hier nicht dargestellt werden. Die Ergebnisse können im Anhangteil Seite 91 Abb. 36 und Tab. 48, 49 eingesehen werden. Es liegt vermutlich ein Fehler in der Durchführung des Tests vor. Siehe hierzu auch Diskussion der Methoden im Anhang Seite 93.

Anhand unserer 3 konkreten Fragestellungen sollen hier die Ergebnisse der biomechanischen Tests dargestellt werden.

**Zu Fragestellung 1:** Führt die Ovariectomie am Modell der Ratte zu einer Minderung der Knochenmineraldichte und/oder zu einer Minderung der biomechanischen Eigenschaften?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Kontrollgruppe (Scheinovarektomie+Placebo) mit der Gruppe OVX+Placebo verglichen.

Die Dreipunktbiegung der Diaphysen der Femora ergab für die Kontrollgruppe einen mit  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis-Test) signifikanten höheren Wert von  $F_{max}$  von 15,37% im Vergleich zur OVX+Placebo-Gruppe (Abb.25, Tab. 31a).

Der Kompressionstest LWK 5 zeigte zwischen den beiden genannten Gruppen signifikante Unterschiede bezüglich  $F_{max}$ . Die Kontrollgruppe hat eine 26,99% höhere  $F_{max}$  (Abb. 26, Tab. 33a).

**Zu Fragestellung 2:** Hat das Chemotherapeutikum Docetaxel auch einen direkten Einfluss auf den Knochen hinsichtlich Knochendichte und biomechanische Eigenschaften?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die beiden Gruppen OVX+Placebo vs OVX+Taxotere® (Docetaxel) miteinander verglichen.

Im Test Dreipunktbiegung der Diaphysen der Femora unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich  $F_{max}$  um 7,62% (höhere Werte für die Gruppe OVX+Placebo), aber dieser Unterschied war nicht signifikant (Abb. 25, Anhang Tab. 31b).

Beim Kompressionstest von LWK 5 unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich  $F_{max}$  um 4,43%, aber auch dieser Unterschied erreichte keine Signifikanz (Abb. 26, Tab. 33a).

**Zu Fragestellung 3:** Kann die gleichzeitige Gabe des Bisphosphonates Ibandronat in der Dosis von  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  und in der Dosierung von  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  einem eventuell schädigenden Einfluss von Docetaxel sowie der Ovariectomie auf den Knochen entgegenwirken?

Zur Beantwortung dieser Frage muss man sich die Ergebnisse der Gruppen mit Ibandronatgabe im Vergleich zu den beiden ovariectomierten Gruppen ohne Ibandronatgabe betrachten. In der Dreipunktbiegung der Diaphysen der Femora zeigte die Ibandronat 25-Gruppe im Vergleich zu OVX+Placebo (20,76%) bzw. OVX+Tax (12,21%) signifikant

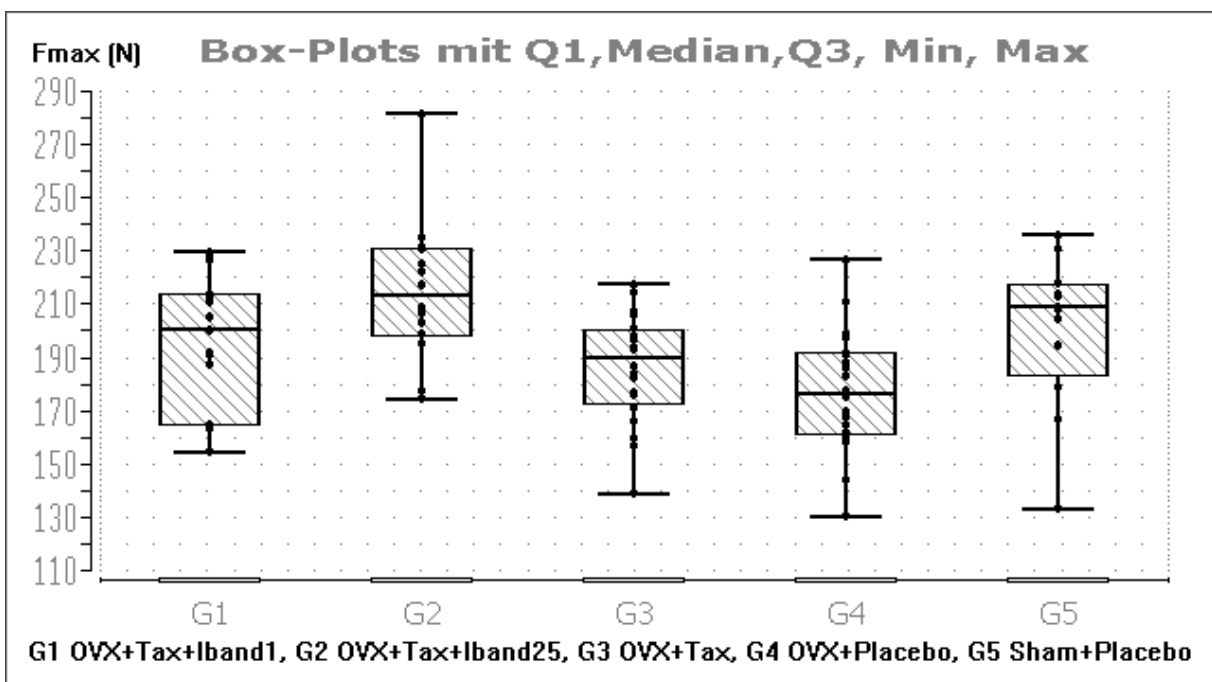
( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) höhere Werte bezüglich Fmax (Abb.25, Tab. 31a). Die Ibandronat 1-Gruppe ergab bezüglich der beiden Vergleichsgruppe ohne Ibandronat für Fmax keine signifikanten Ergebnisse (Anhang Tab. 31b). Die prozentualen Unterschiede lagen in diesen Vergleichen zwischen 5,55-13,6%.

Beim Kompressionstest des LWK 5 erzielten beide Ibandronatgruppen im Vergleich zu den Gruppen OVX+Placebo bzw. Taxotere durchweg signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) bezüglich der erreichten Fmax: OVX+Tax+Iband 25 vs OVX+Tax: Fmax 54,41%, OVX+Tax+Iband 25 vs OVX+Placebo: Fmax 47,57%, OVX+Tax+Iband 1 vs OVX+Tax: Fmax 30,72%, OVX+Tax+Iband 1 vs OVX+Placebo: Fmax 24,93% (Abb. 26, Tab. 33a).

Dreipunktbiegung

Diaphyse

Femora



**Abbildung 25:** Dreipunktbiegetest der Diaphysen von Rattenfemora; Fmax= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens; 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteiltern Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

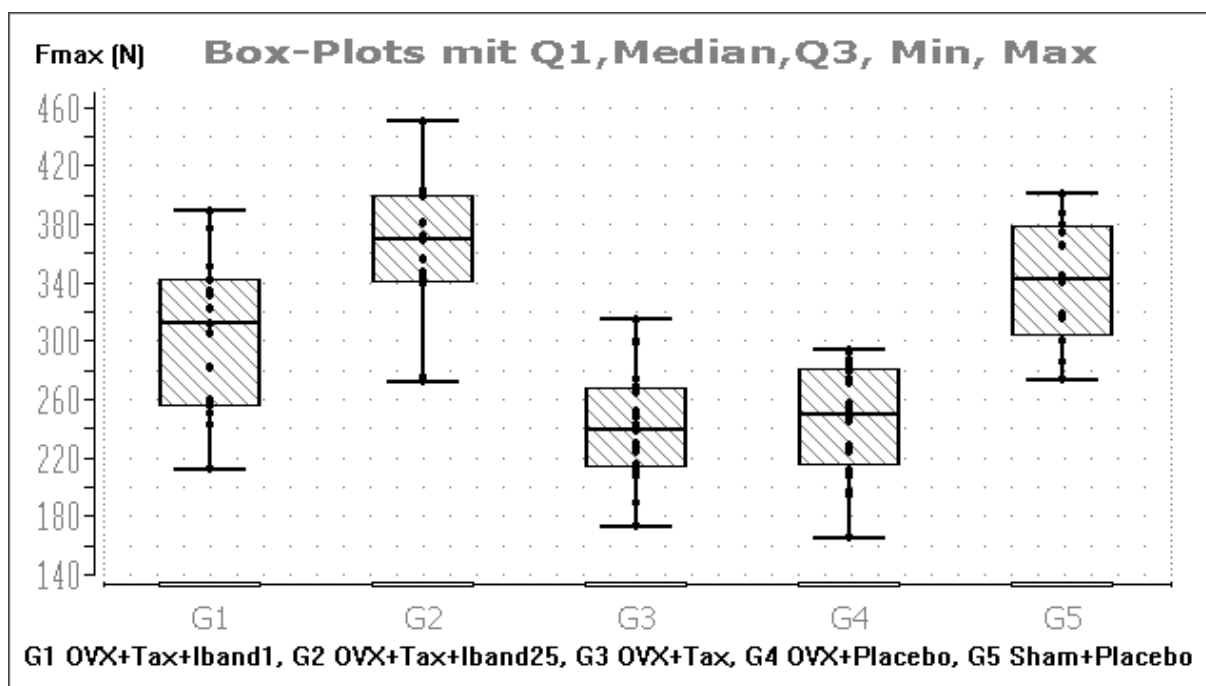
	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	200,5	213,15	189,95	176,5	208,55
<b>Mittelwert</b>	196,31	214,93	186,28	177,33	200,63
<b>Max</b>	229,2	281,4	217,1	226,7	235,9
<b>Min</b>	154,8	174,6	139,5	130,9	133,7

Tab. 30 Absolutwerte Fmax (= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) beim Dreipunktbiegetest an Femora von Ratten 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	20,76%	p= 0,000887
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	12,21%	p= 0,030328
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-15,37%	p= 0,042061

Tab. 31a Signifikante prozentuale Unterschiede der Fmax (maximale Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) im Gruppenvergleich ermittelt mittels Dreipunktbiegetest an Diaphysen rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat (Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 31b)

## Kompressionstest LWK 5



**Abbildung 26:** Kompressionstest an LWK (=Lendenwirbelkörper) 5 von Ratten; Fmax= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens; 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>
	<b>OVX+Tax+ Iband 1µg/kg</b>	<b>OVX+Tax+ Iband 25µg/kg</b>	<b>OVX+Tax</b>	<b>OVX+Placebo</b>	<b>Sham+ Placebo</b>
<b>Median</b>	312,51	369,15	239,07	250,14	342,62
<b>Mittelwert</b>	304,71	362,40	241,0	246,27	340,76
<b>Max</b>	388,86	450,78	314,51	294,36	400,94
<b>Min</b>	50,29	47,63	35,48	36,72	40,10

Tab. 32 Absolutwerte Fmax (= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) beim Kompressionstest von LKW (=Lendenwirbelkörper) 5 von Ratten 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	54,41%	p= 0,000004
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	47,57%	p= 0,000018
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-30,22%	p= 0,000055
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-26,99%	p= 0,000319
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	30,72%	p= 0,010209
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	24,93%	p= 0,034521

Tab. 33a Signifikante prozentuale Unterschiede der Fmax (maximale Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) im Gruppenvergleich ermittelt mittels Kompressionstest am lendenwirbelkörper 5 bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat  
(Ergebnisse der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche siehe Anhang Tab. 33b)



## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion

Durch neue Substanzen bzw. Chemotherapieschemata in der Krebstherapie sowie weiterentwickelter diagnostischer Möglichkeiten mit frühzeitigen Entdeckungen von Krebserkrankung gelingt es immer häufiger, diese kurativ zu behandeln oder zumindest eine Verlängerung der Überlebenszeiten zu erreichen. Dadurch treten Nebenwirkungen bzw. Langzeiteffekte der Chemotherapie folglich immer stärker in den Vordergrund. Bekannt ist, dass einige antineoplastische Substanzen über die Induktion eines Hypogonadismus zu Osteopenie bzw. Osteoporose mit dem Auftreten von Frakturen führen können (Fogelman I, et al. 2003; Letterie GS. 2004; Mahon SM 1998; Mathelin C, et al. 2008; McCunes JS, et al. 2005; Reid DM, et al. 2008; Shapiro CL, et al. 2001, 1997;). Die direkte Wirkung von Chemotherapeutika auf den Knochen ist bisher kaum untersucht worden.

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob Docetaxel, ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Taxane, am Modell der ovariectomierten Ratte eine direkte Veränderung am Knochen hinsichtlich der Knochenmineraldichte und der biomechanischen Eigenschaften bewirkt und ob eine gleichzeitige Gabe von Ibandronat, einem Bisphosphonat, in unterschiedlicher Dosierung dem entgegenwirken kann. Dafür haben wir Knochendichtemessungen in 3 unterschiedlichen Verfahren (DXA, pQCT und  $\mu$ CT) im Bereich der Lendenwirbelkörper sowie Femora an Ratten durchgeführt und 3 unterschiedliche Druckprüfungen ebenfalls im Bereich der Lendenwirbelkörper und Rattenfemora gemacht.

Dabei zeigte sich, dass die Ovariectomie bei der Ratte in beiden Verfahren sowohl DXA als auch  $\mu$ CT eine signifikante Minderung der Knochenmineraldichte im Bereich der Lendenwirbelsäule zwischen 17-21% bewirkt ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) und sowohl im pQCT als auch  $\mu$ CT im Bereich der Schenkelhälfte der Femora ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Knochendichte führt ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test). Die Abnahme der Knochenmineraldichte ist im trabekulären Bereich der Schenkelhälfte besonders stark ausgeprägt und zwar signifikant zwischen 14,91-15,73%. Auf die Knochenmineraldichte im Bereich der Diaphysen wirkt sich die Ovariectomie offensichtlich nicht aus. Ähnliche Ergebnisse zur Ovariectomie-induzierten Minderung der Knochenmineraldichte (BMD) und Veränderung der biomechanischen Eigenschaften zeigen beispielsweise die Studien von Chachra D et al. 2000; Iwamoto J et al. 2006 und Vanin CM et al. 1995.

Des Weiteren führt die Ovariectomie der Ratte zu einer Beeinflussung der biomechanischen Eigenschaften der Knochen sowohl im Bereich der Lendenwirbelsäule signifikant ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) mit 27% höheren Werten für die erreichte  $F_{max}$  (=Maximalkraft bis zum Bruch des Knochens) und im Bereich der Diaphysen der Femora signifikant ( $p > 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) mit 15% höherer  $F_{max}$  (= Maximalkraft bis zum Bruch des Knochens).

Betrachten wir nun die Fragestellung, ob das Chemotherapeutikum Docetaxel einen direkten Einfluss auf den Knochen der Ratten hinsichtlich der Knochenmineraldichte und der biomechanischen Eigenschaften hat, der über den Effekt der Ovariectomie hinausgeht.

In allen 5 DXA-Messungen der Lendenwirbelkörper 4/5 gab es zwischen den Gruppen OVX+Placebo und OVX+Tax keine mit  $p < 0,05$  signifikanten Unterschiede. Die prozentualen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen betragen zwischen 2,25-10,34%.

Bei der Betrachtung der Graphen für die Gruppenvergleiche wird ersichtlich, dass tendenziell die ermittelten Knochendichtewerte der ovariectomierten Tiere mit Docetaxel im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Placebo niedriger sind. Vor allem die letzten beiden Messungen sind von besonderer Relevanz, da diese 6 bzw. 11 Wochen nach dem letzten der 6 Zyklen Docetaxel durchgeführt wurden und somit mögliche Langzeitauswirkungen von Docetaxel auf den Knochen hier in unserem Studienverlauf am deutlichsten werden müssten. In DXA 4 (6 Wochen nach dem letzten Zyklus Docetaxel bzw. Placebo)) hatte OVX+Tax eine 10,34 % geringere mediane BMD als OVX+Placebo. In DXA 5 (11 Wochen nach letztem Zyklus) war die mediane BMD bei OVX+Tax 3,9% niedriger als bei OVX+Placebo. Signifikant ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) zeigen die ovariectomierten Tiere mit Placebo im  $\mu$ CT 9,6% höhere Knochendichtewerte im Bereich von LWK 5 als die ovariectomierten Ratten mit Docetaxel. Tendenziell und teilweise (bei 2 von 4 Vergleichen) signifikant zeigen die ovariectomierten Tiere mit Placebo im Vergleich zur OVX+Tax-Gruppe im pQCT höhere Knochendichtewerte im Bereich der Schenkelhälfte (4,72-6,23% BMD gesamt; 8,75-11,78% BMD trabekulär), nicht aber im Bereich der Diaphysen (0,01-0,09%).

Dies spricht dafür, dass Docetaxel eine Knochenmineraldichteminderung im Bereich der Schenkelhälfte der Femora bewirken kann, aber zu keinen Veränderungen im Bereich der Diaphysen der Femora führt. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der Untersuchungen im  $\mu$ CT der Rattenfemora. Tendenziell und teilweise signifikant zeigen die ovariectomierten Tiere mit Placebo im  $\mu$ CT höhere Knochendichtewerte im Bereich der Trochanteren/Schenkelhälfte (3,99-4,56%) und an den Hüftköpfen (4,64-5,32%), nicht aber im Bereich der Diaphysen (0,32-1,59%). Da spongiöser Knochen eine etwa 8fach höhere

Stoffwechselaktivität aufweist als die Kortikalis (Borders et al 1989), sind in diesem Bereich Veränderungen im Mineralsalzgehalt am ehesten zu erkennen. Die Wirbelkörper der Lendenwirbelsäule bestehen zu 30% aus kortikalem und zu 70% aus spongiösem Knochen (Heuck et al 1989). Während die Trochanterregion des proximalen Femur ein Verhältnis von 50% kortikalem zu 50% spongiösen Knochen aufweist, besteht beim Oberschenkelhals ein Verhältnis von 25% Kortikalis zu 75% Spongiosa (Heuck et al 1989). Den höchsten Anteil an Spongiosa findet man mit 90% am Kalkaneus (Heuck et al 1989). Im Bereich der Schenkelhälfte unterschieden sich die Knochenmineraldichten der einzelnen Gruppen deutlich voneinander – insbesondere bei der trabekulären BMD gibt es prozentual deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die biomechanischen Tests zeigen keine eindeutigen Tendenzen oder signifikante Ergebnisse zwischen den ovariectomierten Tieren mit Placebo bzw. Taxotere. Der Kompressionstest im Bereich von LWK 5 zeigt tendenziell niedrigere Werte von Fmax (4,43%). Aufgrund der signifikanten und tendenziell niedrigeren Knochendichtewerte der OVX+Tax-Gruppe vs OVX+Placebo im Bereich der Schenkelhälfte sowohl im  $\mu$ CT als auch im pQCT wäre von ebenfalls schlechteren biomechanischen Eigenschaften in diesem Bereich auszugehen. Dies zeigte sich nicht. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass insgesamt an der Verwertbarkeit der mittels der Druckprüfung am Schenkelhals der Femora ermittelten Daten Zweifel erhoben werden müssen, da dieser Test in keinem der Gruppenvergleiche signifikante Unterschiede zeigte. Dies widerspricht den Ergebnissen aller anderen durchgeführten Tests deutlich. Hierbei ist ein möglicher Fehler in der Durchführung oder Eignung des Testes zu suchen. Insgesamt waren 6 von möglichen 25 Vergleichen der Ergebnisse (Knochendichtemessungen und biomechanische Tests) zwischen den ovariectomierten Tieren mit Taxotere bzw. Placebo statistisch signifikant. Tendenziell zeigten die Tiere der Gruppe OVX+Tax in DXA,  $\mu$ CT und pQCT insgesamt niedrigere Knochenmineraldichtewerte (nur teilweise signifikant) als die Gruppe OVX+Placebo, und zwar im Bereich der LWS 9,6 % ( $p > 0,05$ ), im Bereich der Schenkelhälfte trabekulär zw. 8,75-11,78% ( $p < 0,05$ ) und Schenkelhälfte gesamt zwischen 4,0-6,2% ( $p < 0,05$ ). Im Bereich der Diaphysen sind die Unterschiede zu vernachlässigen. Die Ergebnisse der biomechanischen Tests sind bezüglich der genannten beiden Versuchsgruppen nicht aussagekräftig. Ist, wie in unserem Tierversuch durch Ovariectomie (OVX) simuliert, bereits eine Östrogenmangel-Osteoporose vorhanden, kann das Chemotherapeutikum Docetaxel zu einem weiteren Verlust der Knochenmineraldichte führen. Somit kann für diese Substanz ein direkter negativer Effekt auf den Knochen angenommen werden, der möglicherweise erst dann auftritt, wenn wie in

unserem Tierversuch durch Ovariectomie simuliert, ein Östrogenmangelzustand besteht. Es wären weitere Studien notwendig, um unsere Ergebnisse zu bestätigen. Bis dato liegen keine weiteren Studien vor, die Auswirkung des Chemotherapeutikums Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und die biomechanischen Eigenschaften des Knochen untersuchten. Es ist lediglich bekannt, dass Docetaxel bei trächtigen Ratten zu einer verzögerten fetalen Ossifikation führt (Bissery et al. 1995). Docetaxel hemmt laut Inoue K 2005 die Proliferation und Aktivität von Mäuseosteoklasten in vitro und induziert deren Apoptose. Minidronat, ein Bisphosphonat, hemmt ebenfalls die Proliferation und Aktivität von Osteoklasten und steigert die Wirkung von Docetaxel auf Osteoklasten (Inoue K 2005).

Es gibt bisher nur eine klinische Studie, welche die direkte Auswirkung einer taxanhaltigen Kombinationschemotherapie auf die Knochenmineraldichte untersuchte. Cameron DA (2010) zeigten in ihrer Studie mit 41 prämenopausalen Frauen, die aufgrund eines frühen Brustkrebses unterschiedliche Chemotherapien (3 CMF, 27 Anthracyclin plus Cyclophosphamid-Regime, 11 Frauen Anthracycline plus ein Taxan) erhalten hatten, dass es während der ersten 6 Monate unter Chemotherapie zu einer signifikanten Minderung der Knochenmineraldichte im Bereich der Lendenwirbelsäule zwischen -6,6% bis -2,48%, geringfügiger auch im Bereich der Hüfte (zwischen -2,56 und -1,61%) kommt und zwar unabhängig vom Alter bei Diagnosestellung, Entwicklung einer Amenorrhoe sowie der Östradiolkonzentration basal und während der Behandlung. Die Östradiolkonzentration im Serum blieben bei den Frauen während der ersten 6 Monate, in denen sie eine Chemotherapie erhielten, konstant. Während dieses Zeitraumes kam es aber bereits zu einer signifikanten Minderung der BMD im Bereich der LWS und Hüfte. Es kam zudem in den 6 Monaten nach Ende der Chemotherapie nur bei den Frauen (n=23) mit niedrigen Östradiolspiegeln ( $E2 < 150 \text{ pmol/l}$ ) oder Amenorrhoe zu einer weiteren Minderung der BMD, obwohl bei allen Gruppen bereits einen Anstieg der Knochenstoffwechselmarker zu verzeichnen war. Allerdings wurde nach der Chemotherapie (nach 6-9 Monaten) eine adjuvante endokrine Behandlung mit Tamoxifen allein oder in Kombination mit Goserelin oder Arimidex begonnen. Die Studie zeigte, dass eine Minderung der Knochenmineraldichte im Bereich der Lendenwirbelsäule und Hüfte unter adjuvanter systemischer Chemotherapie unabhängig von der Ovarialfunktion ist (Cameron DA et al. 2010).

Greep NC, et al. 2003 verglichen die Knochenmineraldichte mittels DXA im Bereich von Lendenwirbelsäule und der Hüfte von postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs, die postoperativ chemotherapeutisch behandelt wurden (n=36) mit denen, die keine adjuvante

Chemotherapie erhielten (n=89). Patienten mit adjuvanter Chemotherapie erhielten Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil oder Adriamycin und Cytosin. Die Knochenmineraldichte an Hüfte, Femur, Trochanter und Wirbelkörpern war bei Frauen, die eine adjuvante Chemotherapie erhielten, durchschnittlich 0,5 SD gering als bei der Vergleichsgruppe ohne Chemotherapie, obwohl die Patientinnen mit Chemotherapie durchschnittlich 6 Jahre jünger waren. Greep NC, et al. schlussfolgern, dass eine adjuvante Chemotherapie sich bei postmenopausalen Frauen ungünstig auf den Knochen auswirkt, möglicherweise durch einen direkten oder indirekten toxischen Effekt der Chemotherapie auf den Knochen zusätzlich zum Östrogenmangel der Menopause oder der Chemotherapie-induzierten Ovarialinsuffizienz (Greep NC, et al. 2003).

In ihren Studien an männlichen Ratten zeigte Cegiela U, et al. (2004), dass 5-FU(Cegiela U, et al. 2004 Nov-Dec), Etoposid (Cegiela U, et al. 2004 May-Jun) und Cyclophosphamid (Cegiela U, et al. 2003) die Knochenumbauprozesse des Knochens stören und zu einer Störung der Mineralisierung führen. Auch die biomechanischen Eigenschaften der Tiere waren vermindert.

Sicherlich kann man nicht von einem Chemotherapeutikum auf das andere schließen, da jedes Zytostatikum unterschiedliche Wirkmechanismen besitzt. Auch wurde Docetaxel oder ein anderes Taxan (Paclitaxel oder „Second Generation Taxan SB-T-1214“) mit ihren möglichen Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel bisher in keiner Studie als alleiniges Agens untersucht.

Betrachten wir nun noch die Auswirkungen der gleichzeitigen Anwendung von Ibandronat in 2 unterschiedlichen Dosierungen unter taxanhaltiger Chemotherapie am Modell der ovariectomierten Ratte.

Die Ergebnisse der DXA-Messungen im Bereich der Lendenwirbelkörper 4/5 zeigen, dass bei ovariectomierten Ratten durch Gabe von Ibandronat in den Dosierungen 1µg/kg und 25µg/kg bei gleichzeitiger Gabe von Docetaxel höhere Knochendichtewerte erreicht werden, im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Docetaxel ohne Ibandronat. Dies zeigte sich auch im µCT von Lendenwirbelkörper 5 mit 36,45-40,66% (p<0,05) höheren Knochendichtewerten für die Tiere mit Ibandronat im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren unter Docetaxel ohne Ibandronat. Unter Ibandronat 25µg/kg-Gabe waren höhere Knochendichtewerte im Bereich der Lendenwirbelsäule im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Taxotere oder Placebo-Gabe sowie Ibandronat 1µg/kg -Gabe zu ermitteln, die BMD-Werte näherten sich den Werten der Kontrollgruppe (Sham+Placebo) bis auf 1%

Unterschied an. Einer durch Ovariectomie bewirkten Minderung der BMD im Bereich der Lendenwirbelsäule am Modell Ratte kann durch Ibandronatgaben in beiden Dosierungen effektiv entgegengewirkt werden. Auch die Ergebnisse des pQCT zeigen, dass durch Gabe von Ibandronat bei ovariectomierten Tieren mit Docetaxel tendenziell und teilweise signifikant höhere Knochendichtewerte im Bereich der Schenkelhalse der Femora erreicht werden, im Vergleich zu den ovariectomierten Gruppen ohne Ibandronat. Im Bereich der Diaphysen der Femora führte die Gabe von Ibandronat zu keinen höheren Knochendichtewerten.

Auch im  $\mu$ CT zeigte sich teilweise signifikant höhere Knochendichtewerte im Bereich der Trochanteren/Schenkelhalse der Femora (8,7-9,42%,  $p < 0,05$ ) und im Bereich der Hüftköpfe der Femora (8,44-9,37%,  $p < 0,05$ ) beider Ibandronatgruppen im Vergleich zu den Gruppen ohne Ibandronat. Im Bereich der Hüftköpfe und Schenkelhalse der Femora kann durch Gabe von Ibandronat 25 $\mu$ g/kg eine deutliche Zunahme der Knochenmineraldichte verzeichnet werden. Auch durch die Gabe von Ibandronat 1 $\mu$ g/kg kann eine Erhöhung der Knochendichte erzielt werden, die jedoch geringer ausfällt als in der Ibandronat 25 $\mu$ g/kg-Gruppe.

Die Ergebnisse der biomechanischen Tests zeigen, dass Ibandronat bei ovariectomierten Ratten, die mit Docetaxel behandelt wurden, die biomechanischen Eigenschaften im Bereich der Lendenwirbelsäule und im Bereich der Diaphysen der Femora verbessert werden.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Ibandronat den negativen Effekt der Ovariectomie als auch den möglichen zusätzlich negativen Effekt von Docetaxel auf den Knochen mindern kann.

Bisphosphonate vermindern die Knochenresorption und reduzieren signifikant die Häufigkeit von Knochenbrüchen bei Patienten mit Knochenmetastasen (Van Beek ER, et al. 2008).

Es ist auch eine Antitumoraktivität der Bisphosphonate selbst in vitro festzustellen, die in vivo-Ergebnisse sind allerdings zweideutig (Van Beek ER, et al. 2008). In präklinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Ibandronat die Masse apoptotischer Tumorzellen in vitro und in vivo erhöht, wahrscheinlich durch Aktivierung von Caspase-artigen Proteasen (Bauss F, Body JJ 2005). In vitro verhindert Ibandronate auch die Adhäsion und die Ausbreitung von Tumorzellen auf den Knochen und die Tumorzellinvasion. Diese inhibitorischen Effekte addierten sich, wenn Ibandronate zusammen mit Paclitaxel oder Docetaxel gegeben wurden (Bauss F, Body JJ 2005). All diese Aspekte machen einen Einsatz

von Bisphosphonaten bei Krebspatienten mit taxanhaltiger Chemotherapie mit Osteoporose und Knochenschmerzen sinnvoll.

## 4.2 Schlussfolgerungen

**Frage 1:** Führt die Ovariectomie am Modell der Ratte zu einer Minderung der Knochenmineraldichte und zu Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens?

Die Knochenmineraldichte (=BMD) im Bereich der Lendenwirbelsäule und der Schenkelhälfte der Femora war bei den ovariectomierten Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Scheinovariectomie) in allen 3 Testverfahren DXA, pQCT und  $\mu$ CT signifikant niedriger. Auch hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften zeigten sich signifikante Unterschiede. Der durch Ovariectomie am Tiermodell Ratte simulierte Östrogenmangel bewirkt eine Minderung der Knochenmineraldichte und eine Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften.

**Frage 2:** Hat das Chemotherapeutikum Docetaxel auch einen direkten Einfluss auf den Knochen hinsichtlich Knochendichte und biomechanische Eigenschaften?

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass Docetaxel zu einem weiteren Verlust der Knochenmineraldichte führt, wenn ein Östrogenmangelzustand wie bei den ovariectomierten Ratten besteht. Der direkte Knochenmineraldichtemindernde Effekt von Docetaxel konnte sowohl im Bereich der Lendenwirbelsäule und als auch am Schenkelhals der Femora am Modell der ovariectomierten Ratte nachgewiesen werden. Es kann kein eindeutig negativer Effekt von Docetaxel auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens gezeigt werden. Der Kompressionstest von LWK 5 liefert Hinweise darauf, dass es unter einer Chemotherapie mit Docetaxel zu einer Verschlechterung biomechanischer Eigenschaften des Knochens kommen kann.

Es wären weitere Studien notwendig, um die beschriebenen signifikanten Unterschiede und Tendenzen zu bestätigen oder zu widerlegen. Bis dato liegen keine weiteren Studien vor, die explizit die Auswirkung des Chemotherapeutikums Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und die biomechanischen Eigenschaften des Knochens untersuchen. Unklar ist es, ob diese direkte Minderung der Knochendichte spezifisch für Docetaxel ist oder für die Substanzgruppe

der Taxane gilt. Da bei Patienten mit malignen Erkrankungen Docetaxel bzw. andere Taxane teilweise über sehr lange Zeit und im Sinne einer Re-Induktion wiederholt verabreicht wird, müsste die Frage beantwortet werden, ob eine Langzeitgabe dieser Substanzen die Knochendichte noch mehr beeinträchtigt.

**Frage 3:** Kann die gleichzeitige Gabe des Bisphosphonates Ibandronat einem eventuell schädigenden Einfluss von Docetaxel auf den Knochen entgegenwirken?

In den vorliegenden Experimenten wurden zwei Dosierungen von Ibandronat verwendet (1µg/kg und 25µg/kg). Ibandronat konnte in beiden Dosierungen den knochenschädigenden Effekt der Ovariectomie und der Chemotherapie deutlich mildern. Erwartungsgemäß zeigt Ibandronat in höherer Dosierung einen stärkeren Effekt in Form höherer BMD und besserer biomechanischer Eigenschaften. Die niedriger dosierte Gabe von Ibandronat erzielte aber ebenfalls deutlich höhere BMD-Werte und verbesserte biomechanische Eigenschaften im Vergleich zur Gruppe der ovariectomierten Tiere unter Docetaxel jedoch ohne Ibandronatgabe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Falle einer Chemotherapie mit Docetaxel das Bisphosphonat Ibandronat der Docetaxel-assoziierten Knochendichteminderung entgegenwirken kann.



## **5 Zusammenfassung**

### **Fragestellung**

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob Docetaxel, ein Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Taxane, am Modell der ovariectomierten Ratte und somit simulierten Östrogenmangelosteoporose eine direkte Veränderung am Knochen hinsichtlich der Knochenmineraldichte und der biomechanischen Eigenschaften bewirkt und ob eine gleichzeitige Gabe von Ibandronat, einem Bisphosphonat, in unterschiedlicher Dosierung dem entgegenwirken kann.

### **Methode**

72 gleich alte, weibliche ovariectomierte Ratten wurden in 4 Gruppen randomisiert aufgeteilt. Sie erhielten 6 Zyklen Docetaxel bzw. Placebo intraperitoneal im Abstand von 3 Wochen und 2 Gruppen zusätzlich Ibandronat in den Dosierungen 1µg/kg oder 25µg/kg einmal wöchentlich subkutan. Eine Kontrollgruppe bestand aus 14 scheinovarectomierten Tieren, die Placebo erhielten. Während und nach den Chemotherapiezyklen wurden insgesamt 5 Knochendichtemessungen der Lendenwirbelsäule mittels DXA-Methode durchgeführt. Nach Tötung der Tiere wurden Knochenmineraldichtebestimmungen mittels pQCT und µCT an der Lendenwirbelsäule, den Diaphysen und Schenkelhälsen der Femora sowie biomechanische Kompressionstests ebenfalls an der Lendenwirbelsäule, den Diaphysen und Schenkelhälsen der Femora durchgeführt.

### **Ergebnisse**

**Zu Frage 1:** Führt die Ovariectomie am Modell der Ratte zu einer Minderung der Knochenmineraldichte und/oder zu einer Minderung der biomechanischen Eigenschaften?

Gegenübergestellt wurden die jeweiligen ermittelten Werte der scheinovarectomierten Ratten mit Placebogabe (Sham+Placebo) gegen die ovariectomierten Tiere mit Placebo (OVX+Placebo) mit dem Ergebnis, dass die Ovariectomie bei der Ratte eine signifikante Minderung (Kruskal-Wallis-Test) der Knochenmineraldichte im Bereich der Lendenwirbelsäule (mittels DXA 16,84-21,24%,  $p$  mind.< 0,013288; mittels µCT 21,9%,  $p=0,000231$ ) und im Bereich der Schenkelhälsen der Femora mittels pQCT für BMD gesamt 6,17% ( $p=0,007190$ ) und für die trabekulären BMD zwischen 14,91% ( $p=0,000249$ ) und

15,73% ( $p=0,000987$ ), im  $\mu$ CT Hüftköpfe 7,21-8,79% ( $p$  mind. $<0,00371$ ), Schenkelhals 7,83-9,52% ( $p$  mind. $<0,037$ ) nicht aber im Bereich der Diaphysen der Femora bewirkt.

Beim Vergleich beider Gruppen (Sham+Placebo vs OVX+Placebo) zeigte sich außerdem, dass die Ovariectomie zu einer Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften der Knochen im Bereich der Lendenwirbelsäule und der Diaphysen der Rattenfemora führt. Im Kompressionstest an LWK 5 war  $F_{max}$  (=maximale Kraft bis zum Bruch des Knochens) der Kontrollgruppe Sham+Placebo signifikant 26,99% höher ( $p=0,000319$ ; Kruskal-Wallis-Test) und im Dreipunkt-Biegetest der Diaphysen der Femora war die  $F_{max}$  signifikant 15,37% höher ( $p=0,042061$ , Kruskal-Wallis-Test) im Vergleich zur OVX+Placebo-Gruppe.

**Zu Frage 2:** Hat das Chemotherapeutikum Docetaxel auch einen direkten Einfluss auf den Knochen hinsichtlich Knochendichte und biomechanische Eigenschaften?

Dafür wurden die Ergebnisse der beiden ovariectomierten Gruppen einmal unter Placebogabe (OVX+Placebo) und zum Zweiten unter Taxoteregabe (OVX+Tax) verglichen.

Die Knochendichtemessung mit DXA im Bereich der Lendenwirbelsäule zeigte keine signifikanten und keine eindeutig tendentiellen prozentualen Unterschiede zwischen den ovariectomierten Ratten mit Taxotere- bzw. Placebo-Gabe.

Im  $\mu$ CT im Bereich von LWK 5 hatte die OVX + Tax-Gruppe nicht-signifikant ( $p=0,494161$ ; Kruskal-Wallis-Test) 9,6% niedrigere Knochendichtewerte als die OVX + Placebo-Gruppe.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten sich bei den Messungen der BMD gesamt der Schenkelhälfte der rechten Femora im pQCT mit 6,23% niedrigeren Werten für die OVX+Tax-Gruppe ( $p=0,044171$ ; Kruskal-Wallis-Test) im Vergleich zu OVX+Placebo sowie bei BMDtrabekulär der Schenkelhälfte der linken Femora mit 11,78% niedrigeren Werten für die OVX+Tax-Gruppe ( $p=0,0331$ ; Kruskal-Wallis-Test).

Auch im  $\mu$ CT zeigten sich signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test) zwischen beiden Gruppen und zwar bei den Messungen der Hüftköpfe der rechten Femora mit 5,31% niedrigeren Knochendichtewerten für OVX+Tax-Gruppe ( $p=0,031164$ ) sowie der Trochanteren/Schenkelhälfte rechte Femora mit 4,56% niedrigeren Knochendichtewerten für OVX+Tax-Gruppe ( $p=0,046805$ ).

Hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften zwischen den beiden Gruppen OVX+Tax und OVX +Placebo können keine eindeutig richtungsweisenden Aussagen getroffen werden. Signifikante Unterschiede gab es nicht.

**Zu Frage 3:** Kann die gleichzeitige Gabe des Bisphosphonates einem eventuell schädigenden Einfluss von Docetaxel sowie der Ovariectomie auf den Knochen entgegenwirken?

Hierfür wurden die Ergebnisse der Gruppe OVX+Taxotere bzw. OVX+Placebo mit den ovariectomierten Tieren+Taxotere und Ibandronatgabe (Dosierungen: 25µg/kg bzw. 1µg/kg) verglichen.

Bei den 5 DXA-Messungen im Bereich der Lendenwirbelkörper der Ratten waren die Werte der medianen BMD der beiden Ibandronatgruppen im Vergleich zu den OVX+Placebo- bzw. OVX/Taxotere-Gruppen stets zwischen 6-26% höher. Die ermittelten prozentualen Unterschiede waren teilweise statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test). Die mittels  $\mu$ CT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Lendenwirbelkörper der Ratten waren bei den beiden Ibandronatgruppen stets signifikant zwischen 23,3 - 40,6 % höher ( $p$  mind.  $< 0,000611$ ; Kruskal Wallis-Test) im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren mit Placebo bzw. Taxotere.

Die mittels pQCT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Schenkelhalse der Femora der beiden Ibandronatgruppen im Vergleich zu den beiden Gruppen OVX+Placebo bzw. OVX+Tax waren höher und teilweise signifikant, für die trabekulär gemessene Knochenmineraldichte 16,4% ( $p=0,0194$ )-21,2% ( $p=0,0009$ ) sowie die gesamte (=mitsamt kortikalem Bereich gemessener BMD) 6,2% ( $p=0,0441$ )-8,89% ( $p=0,0020$ ).

Die mittels  $\mu$ CT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Hüftköpfe der Femora der Ibandronat 25-Gruppe im Vergleich zur Gruppe OVX+Tax waren zwischen 8,4% ( $p=0,0002$ )-9,3% ( $p=0,0024$ ) höher und waren statistisch signifikant.

Die mittels  $\mu$ CT ermittelten prozentualen Unterschiede der medianen BMD im Bereich der Troch./Schenkelhalse der Femora der Ibandronat 25-Gruppe vs der Gruppe OVX+Tax betragen zwischen 8,7% ( $p=0,0009$ )-9,4% ( $p=0,0016$ ) und waren statistisch signifikant höher (Abb. 23, 24, Tab. 27a, 29a). Die Ibandronat 1-Gruppe vs OVX+Tax zeigte teilweise signifikante Ergebnisse mit 5,9% ( $p=0,0148$ ) -6,7 ( $p=0,146$ ) % höheren Werten

In der Dreipunktbiegung der Diaphysen der Femora zeigte die Ibandronat 25-Gruppe im Vergleich zu OVX+Placebo (20,7%,  $p=0,0008$ ) und OVX+Tax (12,2%,  $p=0,0303$ ) signifikant höhere Werte bezüglich Fmax.

Beim Kompressionstest des LWK 5 erzielten beide Ibandronatgruppen im Vergleich zu den Gruppen OVX+Placebo bzw. Taxotere durchweg signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis-Test) bezüglich der erreichten Fmax: OVX+Tax+Iband 25 vs OVX+Tax: Fmax

54,41%,  $p=0,000004$ ), OVX+Tax+Iband 25 vs OVX+Placebo: Fmax 47,5%,  $p=0,000018$ ), OVX+Tax+Iband 1 vs OVX+Tax: Fmax 30,7%,  $p=0,0102$ ; OVX+Tax+Iband 1 vs OVX+Placebo: Fmax 24,9%,  $p=0,0345$ .

### **Schlussfolgerung**

Die Ovariectomie bewirkt bei der Ratte eine signifikante Minderung der Knochenmineraldichte im Bereich der Lendenwirbelsäule und im Bereich der Schenkelhalse der Femora und verschlechtert die biomechanischen Eigenschaften im Bereich der Lendenwirbelsäule. Ist, wie in unserem Tierversuch mit Ratten durch Ovariectomie (OVX) simuliert, bereits eine Östrogenmangel-Osteoporose vorhanden, kann das Chemotherapeutikum Docetaxel zu einem weiteren Verlust der Knochenmineraldichte führen. Die Auswirkungen sind im Bereich der Lendenwirbelsäule größer als im Bereich der Schenkelhalse der Femora, im Bereich der Diaphysen der Femora zu vernachlässigen. Es muss für diese Substanz ein direkter negativer Effekt auf den Knochen angenommen werden, der möglicherweise erst dann auftritt, wenn ein Östrogenmangelzustand besteht.

Es wären weitere Studien notwendig, um die beschriebenen signifikanten Unterschiede und Tendenzen zu bestätigen oder zu widerlegen. Bis dato liegen keine weiteren Studien vor, die die Auswirkung des Chemotherapeutikums Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und die biomechanischen Eigenschaften des Knochen untersuchten.

Ibandronat ist auch unter Chemotherapie mit Docetaxel am Modell der ovariectomierten Ratte eine wirksame Substanz, um einer Minderung der Knochenmineraldichte und Verschlechterung biomechanischer Eigenschaften des Knochens entgegenzuwirken.

## 6 Anhang

**Tabelle 34:** zeitlicher Ablauf des Versuches

Wochen nach Ankunft der Tiere in der Forschungseinrichtung Frankfurt	DXA-Messung	Taxotere®-Gabe bzw. Placebogabe	Ibandronatgabe (1 bzw. 25µg/kg)
1-6 (Erholungsphase)			
7	1.		
8		1. Zyklus	
9-10			+
11		2. Zyklus	+
12-13			+
14		3. Zyklus	+
15			+
16	2.		+
17			+
18		4. Zyklus	+
19-20			+
21		5. Zyklus	+
22-23			+
24		6. Zyklus	+
25	3.		+
26-29			+
30	4.		+
31-34			+
35	5.		+
36 Tötung der Tiere			

### Klinischer Verlauf des Tierversuches

Eine Ratte wurde bereits vor Randomisierung aufgrund eines Nierentumors getötet. 2 Tiere verstarben während der Narkose während der ersten DXA-Messung. Eine Ratte erlitt zeitlich nach der ersten Taxotere-Gabe eine mechanische Verletzung am Hinterlauf. Diese heilte folgenlos aus. Eine weitere Ratte entwickelte einen Tumor am rechten Hinterlauf. Die Tötung des Tieres war nach Rücksprache mit dem betreuenden Veterinärmediziner nicht nötig. Die Ratte überlebte bis Versuchsende. Aufgrund von Gewichtsabnahme vieler Tiere wurde auf Anraten des mitbetreuenden Veterinärmediziners zwischen dem 2. und 3. Zyklus Taxotere das Futter in allen Käfigen von 15g/Tier auf 20g/Tier erhöht.

### Tabellen der nicht-signifikanten Gruppenvergleiche der angewendeten Verfahren

#### DXA

OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	-15,79%	p= 0.109675
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Tax	8,68%	p= 0.118670
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	5,07%	p= 0.584644
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-9,04%	p= 0.584644
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-7,42%	p= 0.943004
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	0,61%	p= 0.943004
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	4,43%	p= 0.943004

Tab. 3b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 1 vor Therapiebeginn; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	10,43%	p= 0,065399
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	7,28%	p= 0,071510
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-10,79%	p= 0,611973
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	-8,20%	p= 0,611973
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-8,06%	p= 0,611973
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	2,94%	p= 0,965679

Tab. 5b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 2 nach 3 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	-13,32%	p= 0.065645
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-9,40%	p= 0,250540
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-4,33%	p= 1,000000
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	2,25%	p= 1,000000

Tab. 7b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 3 nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	13,56%	p= 0.070695
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	-13,23%	p= 0.090914
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	17,19%	p= 0.101109
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-7,47%	p= 0.260733
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-10,34%	p= 0.260733
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	5,07%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-6,23%	p= 1.000000

Tab. 9b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 4 5 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	22,24%	p= 0,100976
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-3,73%	p= 0,159634
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-5,97%	p= 0,175884
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	27,19%	p= 0,242199
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-3,90%	p= 1,000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	19,60%	p= 1,000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	14,94%	p= 1,000000

Tab. 11b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der medianen Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels DXA (= dual x-ray absorptiometry) an Lendenwirbelkörpern 4/5 bei Ratten; DXA 5 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat



OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-9,60%	p= 0,494161
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	-3,66%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-2,99%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-0,69%	p= 1.000000

Tab. 13b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Lendenwirbelkörper 5 bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-4,21%	p= 0.050524
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-2,92%	p= 0.061117
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	-4,26%	p= 0.280328
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	0,01%	p= 0.485609
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	0,05%	p= 0.590757
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	-2,06%	p= 0.590757

Tab. 15b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der gesamten Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	6,28%	p= 0.169012
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-4,72%	p= 0.267840
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	3,76%	p= 0.267840
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-2,40%	p= 0.459851
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-2,65%	p= 0.459851
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	1,26%	p= 0.684224

Tab. 17b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der gesamten Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	10,89%	p= 0.060093
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-8,75%	p= 0.060093
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	10,60%	p= 0.062314
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-8,51%	p= 0,147199
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-6,80%	p= 0,310442
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	1,19%	p= 0,776384

Tab. 19b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der trabekulären Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-10,19%	p= 0.075326
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	5,54%	p= 0,258820
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-2,63%	p= 0.450205
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	2,76%	p= 0.667001

Tab. 21a Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der trabekulären Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-5,46%	p= 0.116214
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	5,30%	p= 0.165180
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-3,72%	p= 0.404098
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	3,57%	p= 0.570139
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	-0,28%	p= 0.591398

Tab. 23b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Hüftkopf rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-4,64%	p= 0.061566
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-3,96%	p= 0,082267
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	3,40%	p= 0.258942
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-4,06%	p= 0.258942
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	4,14%	p= 0.258942
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	-0,70%	p= 0.468262

Tab. 25b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Hüftkopf linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham=Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	-5,51%	p= 0.170244
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Placebo	4,42%	p= 0.503023
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-3,21%	p= 0,990819
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	1,07%	p= 0,990819

Tab. 27b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Schenkelhals rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham=Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

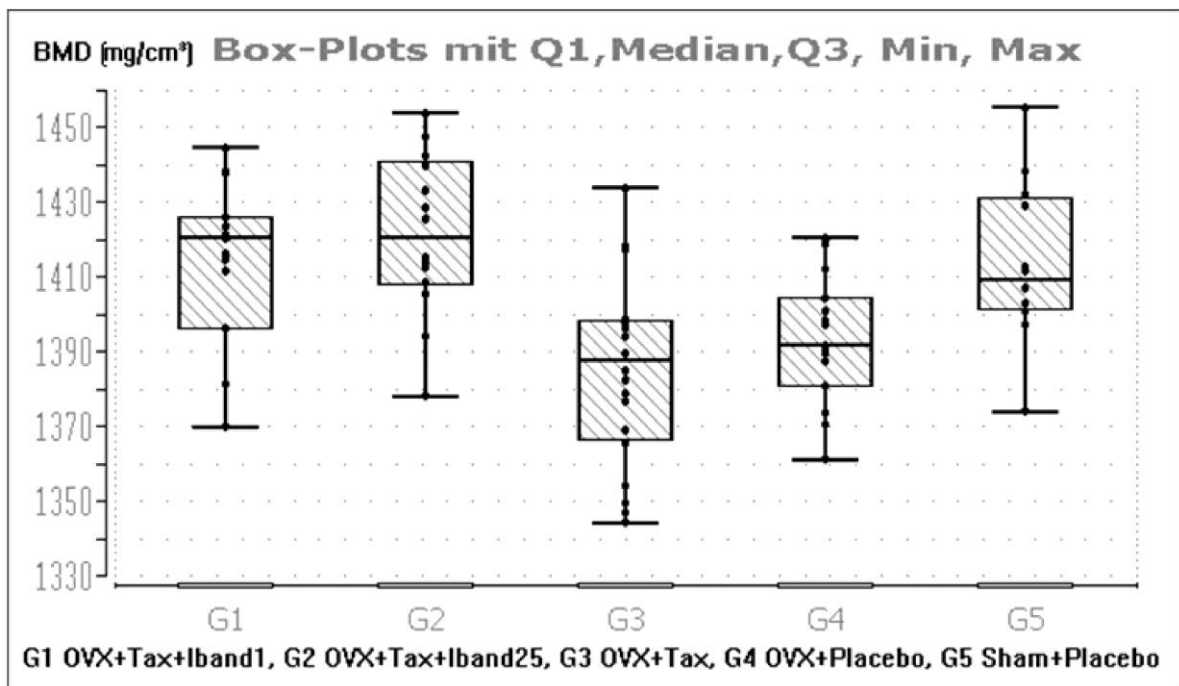
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	6,77%	p= 0.146268
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-3,99%	p= 0.146268
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	-3,81%	p= 0,229247
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	4,36%	p= 0.229247
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-1,77%	p= 0.240143
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	2,51%	p= 0.829663

Tab. 29b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) am Schenkelhals linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham=Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	13,60%	p= 0.204887
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-8,92%	p= 0.387674
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-5,93%	p= 0.472491
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	5,55%	p= 0.965059
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	7,62%	p= 0.965059
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	2,21%	p= 0.965059
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	3,86%	p= 0.965059

Tab. 31b Nicht-signifikante prozentuale Unterschiede der Fmax (maximale Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) im Gruppenvergleich ermittelt mittels Dreipunktbiegetest an Diaphysen rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham=Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

### pQCT Diaphysen der Femora



**Abbildung 28:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an Diaphysen der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

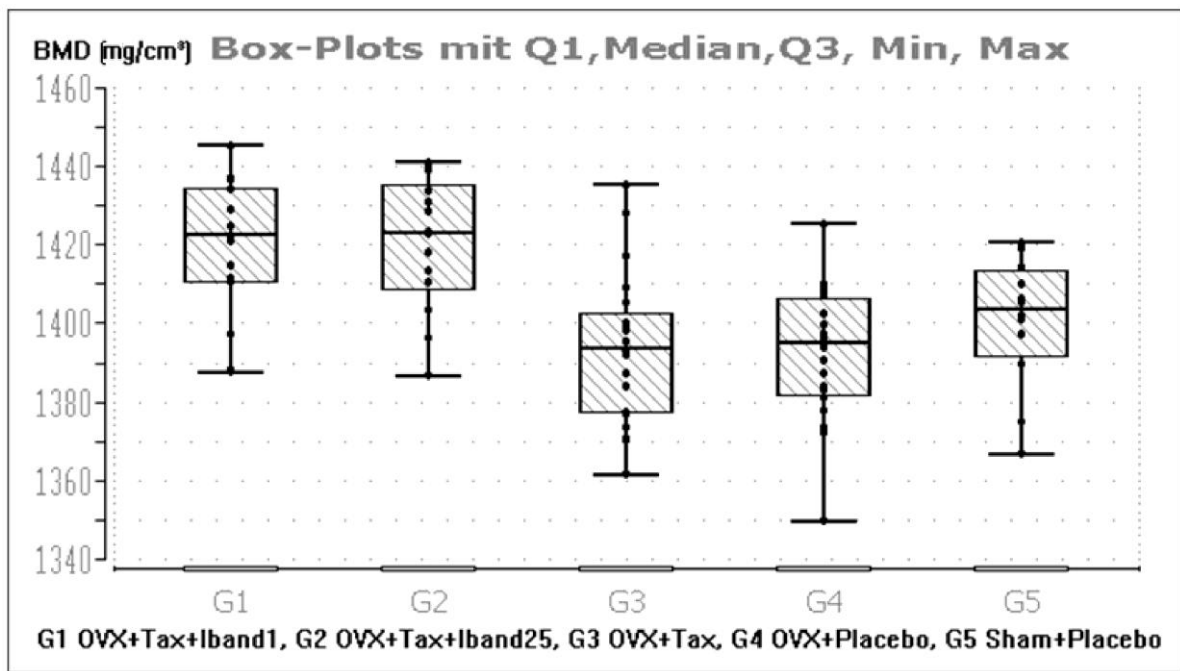
	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.</b> <b>1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.</b> <b>25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Mittelwert</b>	1414,7	1421,48	1385,75	1393,23	1413,73
<b>Median</b>	1420,4	1420,45	1387,35	1391,5	1409,35
<b>Max</b>	1444,5	1453,9	1434,0	1420,3	1455,6
<b>Min</b>	1370,3	1378,5	1344,4	1361,5	1374,3

Tab.35 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Diaphysen rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	2,39%	p= 0,001366
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	2,38%	p= 0,009823
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	2,08%	p= 0,015416
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-1,56%	p= 0,036043

OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	2,08%	p= 0.060806
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-1,27%	p= 0.145707
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	0,79%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax+Iband 25	0,00%	p= 1.000000
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	0,01%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	0,78%	p= 1.000000

Tab. 36 Prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) an Diaphysen rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat



**Abbildung 29:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an Diaphysen der linken Femora von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quantil), Median, Q3 (0,75-Quantil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

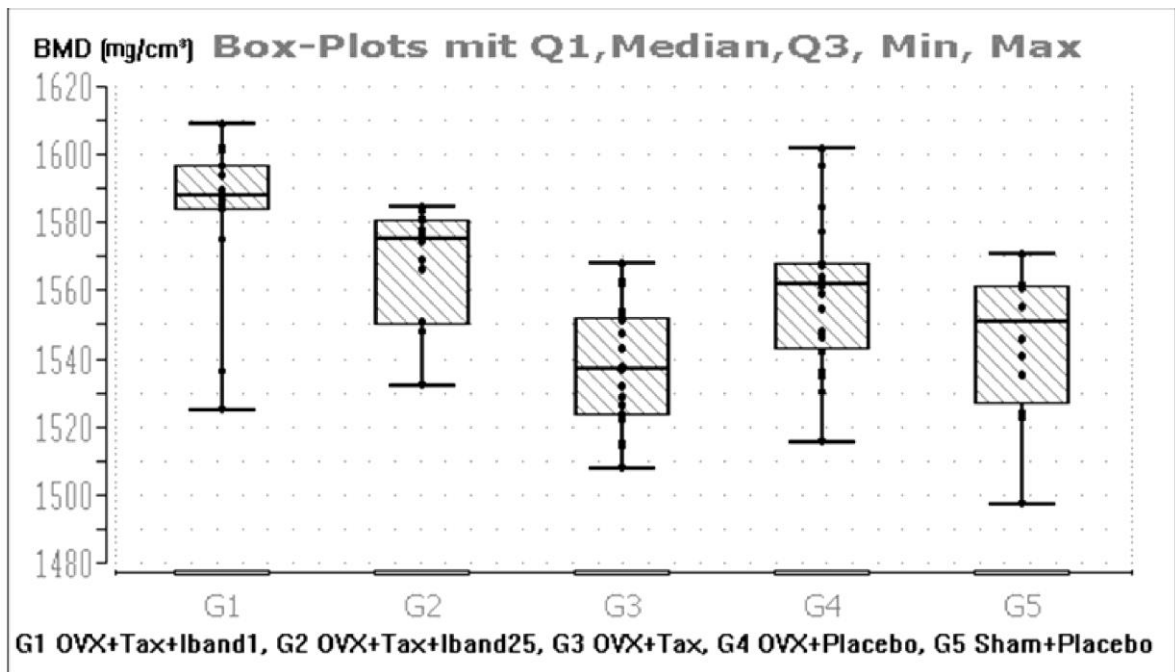
	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband</b> <b>1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband</b> <b>25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1422,6	1423,2	1393,7	1394,9	1403,75
<b>Mittelwert</b>	1419,44	1420,71	1393,82	1392,36	1400,74
<b>Max</b>	1445,3	1441,2	1435,1	1425,3	1420,6
<b>Min</b>	1388,1	1386,9	1361,7	1350,1	1366,9

Tab.37 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels pQCT (= periphere quantitative Computertomographie) an Ratten; Diaphysen linke Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	2,03%	p= 0,001289
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	2,17%	p= 0,001513
OVX+Tax+Iband25	vs	OVX+Tax	2,12%	p= 0,001513
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	2,07%	p= 0.001547
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	1,39%	p= 0,136702
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	1,34%	p= 0.143921
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-0,63%	p= 0.919415
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-0,72%	p= 0.919415
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	-0,04%	p= 1,000000
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-0,09%	p= 1,000000

Tab. 38 Prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels pQCT (=periphere quantitative Computertomographie) an Diaphysen linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

### μCT der Diaphysen der Femora



**Abbildung 30:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) mittels  $\mu\text{CT}$  (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an den Diaphysen der rechten Femora von Ratten; OVX= Ovariectomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.</b> <b>1<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband. 25<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math></b>	<b>G3</b> <b>OVX+Taxotere</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1587,71	1575,02	1536,87	1561,74	1550,62
<b>Mittelwert</b>	1583,28	1566,76	1537,09	1558,86	1544,40
<b>Max</b>	1609,09	1584,44	1568,17	1601,49	1570,61
<b>Min</b>	1525,50	1532,34	1507,97	1516,19	1497,98

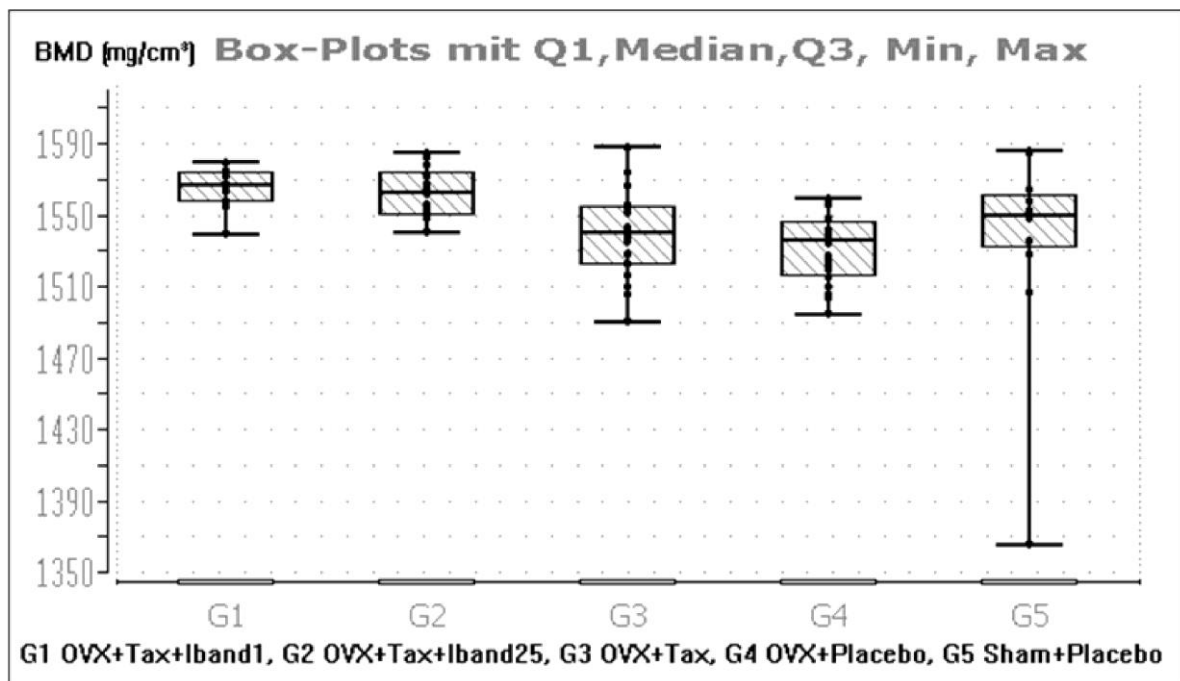
Tab. 39 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ )) mittels  $\mu\text{CT}$  (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Diaphysen rechte Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovariectomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum



OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	3,31%	p= 0,000001
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	2,39%	p= 0,000900
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	2,48%	p= 0,004280
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	1,66%	p= 0,036827
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-1,59%	p= 0,037622

OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	1,57%	p= 0.115061
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	0,81%	p= 0.397330
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	0,72%	p= 0.397330
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	0,85%	p= 0.656381
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-0,87%	p= 0.656381

Tab. 40 Prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels  $\mu$ CT (=Mikro-Computertomographie) an Diaphysen rechter Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat



**Abbildung 31:** Knochendichtemessung (BMD= bone mineral density ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) mittels  $\mu$ CT (= Mikro-Computertomographie) 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere an den Diaphysen der linken Femora von Ratten; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilteten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.</b> <b>1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband.</b> <b>25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	1566,85	1562,05	1540,42	1535,44	1549,29
<b>Mittelwert</b>	1566,09	1562,40	1539,56	1530,83	1537,09
<b>Maximum</b>	1579,24	1585,23	1587,79	1559,50	1586,37
<b>Minimum</b>	1539,55	1540,61	1491,0	1495,43	1366,45

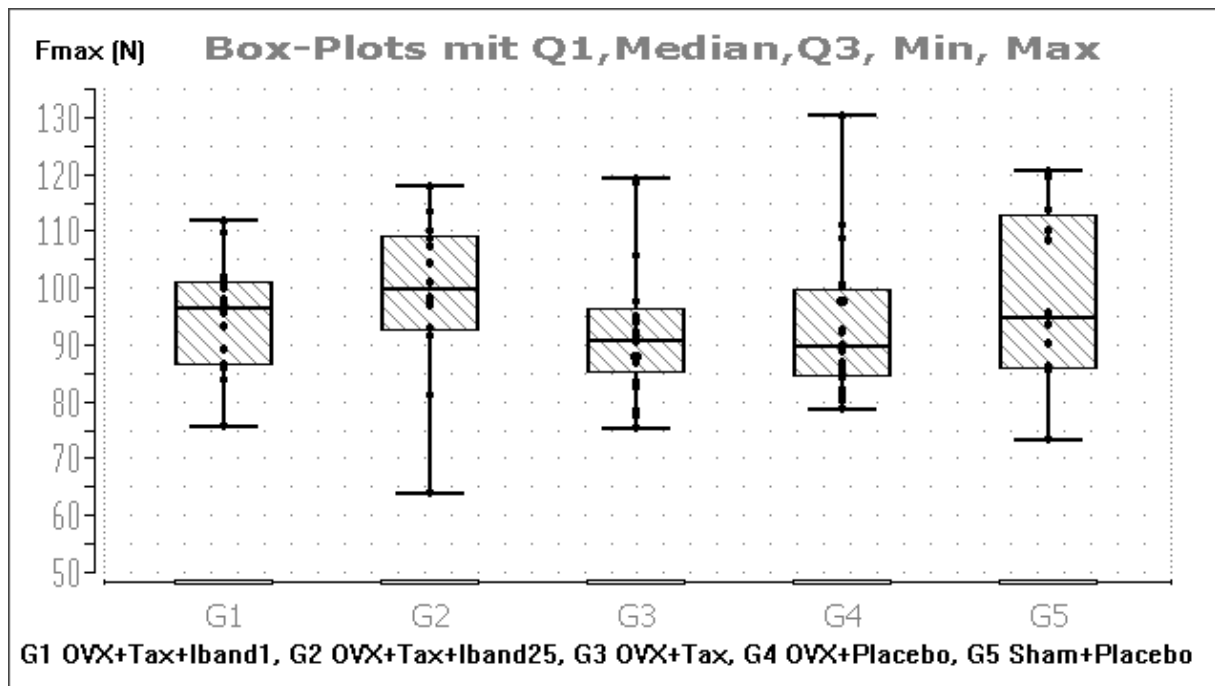
Tab.41 Absolutwerte Knochenmineraldichte (BMD=bone mineral density (mg/cm<sup>3</sup>)) mittels µCT (= Mikro-Computertomographie) an Ratten; Diaphysen linke Femora: 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Placebo	2,05%	p= 0,000008
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	1,73%	p= 0,000365
OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax	1,72%	p= 0,001668
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	1,40%	p= 0,025176

OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	1,13%	p= 0.083293
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-0,89%	p= 0.179767
OVX+Tax+Iband25	vs	Sham+Placebo	0,82%	p= 0.304449
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	0,32%	p= 0.518715
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-0,57%	p= 0.724849
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband25	0,31%	p= 0.724849

Tab. 42 Prozentuale Unterschiede der Knochenmineraldichte im Gruppenvergleich ermittelt mittels µCT (=Mikro-Computertomographie) an Diaphysen linker Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit p<0,05; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

## Druckprüfung Schenkelhals Femora



**Abbildung 32:** Druckprüfung am Schenkelhals von Rattenfemora; Fmax= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens; 10 Wochen nach 6. Zyklus Taxotere; OVX= Ovarektomie, Tax=Taxoteregabe; Iband= Ibandronatgabe, Sham= Scheinovarektomie; G= Gruppen 1-5; G1n=15, G2 n=14, G3n=21, G4 n=20, G5 n=13; Boxplots unter Angabe von Min=Minimum, Q1 (0,25-Quartil), Median, Q3 (0,75-Quartil), Max=Maximum bei nicht gaußverteilten Werten, Der Quartilenabstand zwischen Q1-Q3 umfasst 50% aller Werte.

	<b>G1</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 1µg/kg</b>	<b>G2</b> <b>OVX+Tax+</b> <b>Iband 25µg/kg</b>	<b>G3</b> <b>OVX+Tax</b>	<b>G4</b> <b>OVX+Placebo</b>	<b>G5</b> <b>Sham+Placebo</b>
<b>Median</b>	96,5	99,8	90,5	89,5	94,8
<b>Mittelwert</b>	95,15	99,06	91,79	93,07	98,66
<b>Max</b>	111,7	117,8	119,1	130,4	120,7
<b>Min</b>	75,9	64	75,4	79	73,6

Tab. 43 Absolutwerte Fmax (= maximal aufgewendete Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) bei der Druckprüfung am Schenkelhals an Femora von Ratten 10 Wochen nach 6. Zyklen Taxotere; Gruppen 1-5: G1 n=15; G2 n=14; G3 n=21; G4 n=20, G5 n=13; OVX=Ovarektomie, Tax = Taxotere, Iband= Ibandronat, Sham= Scheinovarektomie; Max= Maximum, Min= Minimum

OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Tax	10,28%	p= 0.313256
OVX+Tax+Iband 25	vs	OVX+Placebo	11,51%	p= 0.432752
OVX+Tax	vs	Sham+Placebo	-4,54%	p= 1.000000
OVX+Placebo	vs	Sham+Placebo	-5,59%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax	6,63%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Placebo	7,82%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-3,31%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	5,27%	p= 1.000000
OVX+Tax+Iband1	vs	Sham+Placebo	1,79%	p= 1.000000
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	1,12%	p= 1.000000

Tab. 44 Prozentuale Unterschiede der Fmax (maximale Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) im Gruppenvergleich ermittelt mittels Druckprüfung am Schenkelhals der Femora bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

OVX+Tax+Iband 1	vs	OVX+Tax+Iband 25	-15,34%	p= 0.163890
OVX+Tax+Iband 1	vs	Sham+Placebo	-8,79%	p= 0.431656
OVX+Tax+Iband 25	vs	Sham+Placebo	7,74%	p= 1.000000
OVX+Tax	vs	OVX+Placebo	-4,43%	p= 1.000000

Tab. 33b Prozentuale Unterschiede der Fmax (maximale Kraft (N) bis zum Bruch des Knochens) im Gruppenvergleich ermittelt mittels Kompressionstest am Lendenwirbelkörper 5 bei Ratten 10 Wochen nach 6 Zyklen Taxotere; Signifikanzprüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test; signifikante Ergebnisse mit  $p < 0,05$ ; OVX=Ovarektomie, Sham= Scheinovarektomie, Tax= Taxotere, Iband= Ibandronat

## Diskussion des Tiermodells und Übertragbarkeit auf den Menschen

Die pathophysiologischen Mechanismen des Knochenverlustes der Ratte entsprechen denen beim Menschen (Frost HM, Jee WS 1992). Vergleichbar mit dem Menschen ist auch, dass Ratten kontinuierliche Zyklen durchlaufen und somit ein längerfristiger Östrogenmangel -im Versuchsfall durch Ovarektomie induziert, bei den Frauen postmenopausal- zu einer starken

Veränderung im Knochenstoffwechsel führt. Die Ratte hat keine natürliche Menopause, diese wird aber durch eine Ovariectomie künstlich erzeugt (Wronski TJ, Yen C-F. 1991). Bei Ratten führt die Ovariectomie zu gesteigertem Knochenumbau, wobei der stärkere Abbau durch einen ebenfalls höheren Aufbau nicht komplett ausgeglichen werden kann (Kalu 1991; Glatt 2001). Von diesen Vorgängen sind der trabekuläre Knochen und das axiale Skelett stärker betroffen als kortikaler und peripherer Knochen (Chachra D et al. 2000). Eine sehr ähnliche Situation finden wir beim Menschen. Die Ovariectomie erzeugt bei der Ratte eine Minderung der Knochenmineraldichte (BMD) (Chachra D et al. 2000; Vanin CM et al. 1995; Iwamoto J et al. 2006). Auch in unserer Studie ist ein eindeutiger Effekt der Ovariectomie in Form von Minderung der Knochenmineraldichte in der Lendenwirbelsäule sowohl bei DXA, pQCT und  $\mu$ CT teilweise signifikant festzustellen. Allerdings besitzen Ratten kein Havers'sches System und weisen damit keinen intrakortikalen Knochenumbau auf. Außerdem ist die Osteoblastenfunktion in späteren Stadien des Östrogenmangels unbeeinflusst (Wronski TJ, Yen C-F. 1991). Chachra D et al. 2000 untersuchte in einer Studie den Einfluß der Ovariectomie auf die mechanischen Eigenschaften (Dreipunkt-Biegung der Femora und Kompressionstests der Lendenwirbelsäule) des Knochens am Modell der Ratte. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen der ovariectomierten und nicht-ovariectomierten Tiere bezüglich der mechanischen Eigenschaften bei der Dreipunkt-Biegung der Femora. Auch die mechanischen Eigenschaften der Wirbelkörper blieben von der Ovariectomie unbeeinflusst. Chandra stellte die These auf, dass die durch Ovariectomie bewirkten mechanischen Veränderungen im trabekulären Knochen stattfinden und die Kortikalis unbeeinflusst lassen. Bei Kompressionstests an Lendenwirbelkörpern der Ratte zeigte sich bei Vanin CM, et al. 1995, dass die ovariectomierten Ratten die niedrigsten Elastizitätsmodule aller Gruppen aufwiesen (Vanin CM, et al. 1995). Ähnliche Ergebnisse erzielte Iwamoto J et al. mit seinen Untersuchungen an Rattentibiae und -femora (Iwamoto J, et al. 2006).

## **Diskussion der Methoden**

### **DXA**

Die Genauigkeit von Wiederholungsmessungen der DXA liegt zwischen 1-3% (Götte und Dubs 2002). Von Nachteil ist, dass das Verfahren lediglich Projektionsbilder liefert, die keine Differenzierung zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen erlauben (Rosen et al. 1995) und statt einer echten Volumendichte nur die Bestimmung einer Flächendichte ermöglichen (Kanis et al. 1996). Dambacher et al (2002) konnten in einer Studie zeigen, dass bei DXA-

Messungen trotz normaler integraler BMD ein Osteoporose-T-Wert der Spongiosa über 25% vorhanden sein kann (Dambacher et al 2002). Die Richtigkeit der gemessenen Ergebnisse, also in wie weit diese auch den tatsächlichen Knochendichtewerten entsprechen, hängt auch von der Dicke der umgebenden Weichteile ab. Laut Hansen et al. (1990) bewirkt eine Änderung des Fettanteils von 10% eine Änderung der Knochendichte um 1% (Hansen et al. 1990). Ossäre Überlagerungen durch hypertrophische oder degenerative Veränderungen an den Wirbelkörpern sowie Aortenverkalkungen und Wirbelkörperfrakturen können zu falsch erhöhten Ergebnissen führen (Stewart et al 1990). Bei unseren Versuchstieren ist aber aufgrund ihres jungen Alters nicht von maßgeblichen degenerativen Veränderungen auszugehen. Die Strahlstabilität wurde vor Beginn der Messungen am jeweiligen Untersuchungstag durch eine Phantommessung geprüft. Ebenso haben die Lagerung des Tieres, Bewegungsartefakte, die Durchführung der Messungen selbst sowie die Festlegung der ROI (region of interest) zur anschließenden Auswertung entscheidenden Einfluss auf die Präzision und damit die Streuung der Werte. Die Messungen erfolgten in Narkose der Tiere. Durch die Haltevorrichtung konnten die Tiere gut reproduzierbar positioniert werden. Bei den kleinsten Bewegungen wurde sofort der Scan abgebrochen und nach intensivierter Narkose erneut erstellt. An den Messdurchführungen waren nach genauer Arbeitsanweisung immer dieselben Personen beteiligt. Zur Identifizierung der zu messenden Wirbelkörper wurde bei jedem Tier immer ein Übersichtsscan bis zum Beckenkamm aufgenommen. Im Anschluss daran wurden die ROI festgelegt und analysiert.

### **pQCT**

Laut Hassager und Christiansen 1995 sowie Takada et al. 1996 ist die Richtigkeit dieses Verfahrens vor allem vom Fettanteil im Knochenmark abhängig. Ein hoher Fettanteil täuscht eine geringere Knochendichte vor. Die Präzision ist durch die Stabilität der Röntgenstrahlen beeinflusst. (Genant et al. 1996). Diese wurde am jeweiligen Untersuchungstag durch die Messung eines Standardphantoms überprüft. Aufgrund der ungleichen Verteilung der Knochendichte bei Osteoporose ist die genaue Positionierung des CT-Schnittes sehr wichtig, die immer von denselben am Versuch beteiligten Personen nach eingehender Anweisung vorgenommen wurde. Das von uns verwendete pQCT der Firma Stratec wurde in einer Studie von Takada et al. (1996) als mäßig richtig, aber hoch präzise eingestuft. In einer anderen Studie wird die Abweichung des Gerätes mit 1,9% für trabekulären und 14% für kortikalen Knochen angegeben (Augat et al. 1998). Der Präzisionsfehler liegt bei 0,3-2,2% (Augat et al. 1998). Auch in klinischen Untersuchungen an Frauen konnte eine hohe Präzision der pQCT-

Messung hinsichtlich BMD und Mikroarchitektur des Knochens ermittelt werden (Boutroy S et al. 2005).

### **μCT**

Bagi CM, et al 2006 konnte in seiner Studie an männlichen kastrierten Ratten feststellen, dass das μCT im Vergleich zu anderen nicht-invasiven Verfahren wie DXA und pQCT zur Ermittlung von Knochenmasse und Knochenstruktur durchaus geeignet ist und schnelle, reproduzierbare und akurate Antworten zur kortikalen Knochengeometrie als Hinweis auf die kortikale Knochenstärke geben kann.

Studienergebnisse mit genauen Angaben zur Richtigkeit und Präzision des Verfahrens liegen nicht vor.

### **Biomechanische Tests**

Mit den biomechanischen Prüfungen soll die elastische Komponente des Knochens untersucht werden. Solange die elastische Belastbarkeitsgrenze nicht überschritten ist, geht der Knochen nach axialer Druckbelastung in seine Ausgangslage zurück. Die Verformung des Knochens ist reversibel. Die Elastizität hängt entscheidend vom trabekulärem Knochen ab. Laut Linde et al. (1992) ist die Richtigkeit bei destruierenden Druckprüfungen, wie wir sie durchgeführt haben, besser als bei nicht-destruierenden. Allerdings muß hier angeführt werden, dass von der Tötung unserer Tiere bis zur druckmechanischen Prüfung 14 Wochen vergingen. Die Proben wurden bis zur Verwendung tiefgefroren. Vor den Tests wurden die Biopate aufgetaut und in physiologischer Kochsalzlösung bei Raumtemperatur (20-22°C) feucht gehalten. Es ist also einerseits davon auszugehen, dass sich die mechanischen Eigenschaften des Knochens allein schon durch die lange Zeitspanne von Probengewinnung bis zur Testung verändert haben. Laut Fitzgerald 1977 treten die ersten Veränderungen am Knochen bereits 24 Stunden post mortem auf. Ebenso ist anzuführen, dass das Elastizitätsmodul bei Raumtemperatur 7% und die Druckfestigkeit 5% höher liegt als bei Körpertemperatur (Brear et al. 1988). Auch die Testrichtung ist von entscheidender Bedeutung, da trabekulärer Knochen anisotrop ist. Unterschiedliche Belastungsrichtungen liefern unterschiedliche Ergebnisse. Die Druckprüfung am Schenkelhals der Femora und an den Lendenwirbelkörpern erfolgte in physiologischer Belastungsrichtung.

Aufgrund der durchweg nicht-signifikanten Ergebnisse bei der Druckprüfung der Schenkelhäse der Femora, welche den Ergebnissen aller anderen Untersuchungen widersprechen, ist an der Exaktheit der Durchführung dieses Verfahrens zu zweifeln.

Leppänen O et al. verglich den Dreipunkte-Biegungstest an 38 Femurpaaren von Ratten hinsichtlich der Durchführung in der zumeist genutzten anteroposterioren Richtung mit der Testung in mediolateraler Richtung. Er kam zum Ergebnis, dass der Dreipunkte-Biegungstest an den Diaphysen von Rattenfemora in mediolateraler Richtung eine genaue und biologisch stichhaltige Methode ist, um die strukturelle Stärke dieses häufig für experimentelle Knochenforschung genutzten Skelettabschnittes zu bestimmen. (Leppänen O et al. 2006)

### **Vergleichbarkeit bzw. Korrelation der angewendeten Verfahren**

Järvinen et al. 1998 verglich die Korrelation der Daten der DXA-Messung (BMD und BMC) mit mechanischen Tests an 51 Ratten Femurschaftpaaren bzw. Schenkelhalspaaren. Die Reproduzierbarkeit der DXA-Messungen ist mit einer Schwankungsbreite von 1,2%-3,9% für die BMD und von 1,6%-13,8% für die BMC sehr gut. Die Reproduzierbarkeit der biomechanischen Tests (anteroposteriore Dreipunkte-Biegung des Femurschaftes und Kompressionstest des Schenkelhalses) ist mit einer Variation zwischen 5,0%-14,7% gut. Trotz der hohen Gruppenkorrelation zwischen den DXA-basierenden Voraussagen bezüglich der Knochenstärke und der tatsächlichen Maximalkraft bis zum Knochenbruch der Rattenfemora und der guten Präzision der DXA selbst, bleibt die Vorhersagbarkeit der tatsächlichen biomechanischen Eigenschaften des individuellen Knochen durch DXA-Messungen relativ schlecht. (Järvinen TL et al. 1998). Eine Untersuchung der Korrelation zwischen dem pQCT und dem Dreipunkte-Biegungstest an 10 Paar männlichen Mäusefemora und -tibiae zeigt, dass das hochauflösende pQCT eine höhere Präzision hat als der Dreipunkttest (Jämse T et al. 1998).

Eine gute Korrelation der Daten zwischen Knochendichtemessungen mit pQCT und DXA sowie biomechanischen Test an 103 weiblichen Rattenfemora konnte auch die Untersuchung von Ferretti et al. aufzeigen (Ferretti JL et al. 1996).

Auch Bagi CM et al. konnte bei Untersuchungen an Ratten eine gute Korrelation der Daten zwischen DXA, pQCT,  $\mu$ CT und dem Dreipunktbiegungstest feststellen (Bagi CM et al. 2006).



## Literaturverzeichnis

- 1 Augat P, et al. Accuracy of cortical and trabecular bone measurements with peripheral quantitative computed tomography (pQCT). *Phys.Med.Biol.*1998a; 43:2873-2883
- 2 Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone*. 2006 Jan; 38(1):136-44. Epub 2005 Nov 18
- 3 Bartl R, Frisch B. *Das Bisphosphonat-Manual Wirkungen Indikationen Strategien Trends*.1.Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien 2001 ISBN 3-89412-471-7
- 4 Bartl R. 24 Osteoporose in der Onkologie: Tumorthherapieinduzierte Osteoporose. [http://www.onkodin.de/zms/content/e6/e38842/e42271/e42325/index\\_print\\_ger.html](http://www.onkodin.de/zms/content/e6/e38842/e42271/e42325/index_print_ger.html)  
Letzte Änderung: 25.01.2006
- 5 Bauss F, Body JJ. Ibandronate in metastatic bone disease: a review of preclinical data. *Anticancer Drugs*. 2005 Feb;16(2):107-18.
- 6 Bissery MC, et al. Docetaxel (Taxotere): a review of preclinical and clinical experience. Part I: preclinical experience. *Anti-Cancer Drugs* 1995; 6: 339-368
- 7 Bissett D, et al. Phase I and pharmacokinetic study of Taxotere (RP 56976) administered as a 24-hour infusion. *Cancer Res* 1993; 53: 523-527
- 8 Bonney R. *The complete guide to osteoporosis*. PJB Publications 1996
- 9 Borders J, et al. Quantitative Dual-Energy Radiographic Absorptiometry of the lumbar spine: In vivo comparison with Dual-Photon Absorptiometry. *Radiology* 1989; 170:129-131
- 10 Boutroy S, Bouxsein ML, Munoz F, Delmas PD. In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6508-15.
- 11 Brear K, et al.: Density and temperature effects on some mechanical properties of cancellous bone. *Eng Med* 1988; 17:163-167

- 12 Bruno R, Sanderink GJ. Pharmacokinetics of Taxotere. *Cancer Surv* 1993; 17: 305-313
- 13 Cameron DA, Douglas S, Brown JE, Anderson RA. Bone mineral density loss during adjuvant chemotherapy in pre-menopausal women with early breast cancer: is it dependent on oestrogen deficiency? *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct; 123(3):805-14. Epub 2010 Aug 5.
- 14 Carbonare LD, et al. Effects of long-term administration of methotrexate on bone mineral density in rheumatoid arthritis. *Calcif Tissue Int* 1999;64:100-101
- 15 Cegięła U, Folwarczna J, Pytlik M, Janiec W. Effect of etoposide on the processes of osseous tissue remodeling in rats. *Pol J Pharmacol.* 2004 May-Jun;56(3):327-36.
- 16 Cegięła U, Pytlik M, Janiec W. Changes and their regression in the osseous system in rats after administering a cytostatic drug inhibiting tumor cell division in the phase of DNA synthesis. *Pol J Pharmacol.* 2004 Nov-Dec;56(6):805-16.
- 17 Cegięła U, Piatek A, Janiec W, Nowińska B, Pytlik M, Folwarczna J, Kwiatkowski Z, Kaczmarczyk-Sedlak I. [Effect of cyclophosphamide on bone remodeling in rats] *Przegl Lek.* 2003;60(5):329-33.
- 18 Chachra D, Lee JM, Kasra M, Grynblas MD. Differential effects of ovariectomy on the mechanical properties of cortical and cancellous bone in rat femora and vertebrae. *Biomed Sci Instrum.* 2000;36:123-8.
- 19 Clézardin P, Fournier P, Boissier S, Peyruchaud O. 2 In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. *Curr Med Chem.* 2003 Jan;10(2):173-80.
- 20 Cook M, Larke Ec. Resistance of copper and copper alloys to homogenous deformation in compression. *J Inst Metal* 71, 1945:371-390
- 21 Cooper C. Beyond daily dosing: clinical experience. *Bone.* 2006 Apr;38(4 Suppl 1):S13-7. Epub 2006 Mar 7
- 22 Dambacher MA, et al. Überlegungen zur Therapie der Osteoporose. In: *Praktische Orthopädie.* 41. Tagung des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie e.V. Osteoporose. Herausgeber Hedtmann A und Götte S. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2002

- 23 Delmas PD, Fontana A. Bone loss induced by cancer treatment and its management. *European Journal of Cancer*, 1998; 34 (2):260-262
- 24 De Schepper, et al. Bone metabolism and mineralisation after cytotoxic chemotherapy including isofosfamide. *Arch Dis Child* 1994;71:346-348
- 25 De Valeriola, et al. Study of excretion balance, metabolism and protein binding of <sup>14</sup>C-radiolabelled Taxotere (TXT) (RP 56976, NSC 628503) in cancer patients. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1993; 34: 373
- 26 DVO-Leitlinie Osteoporose 2009, [www.dv-osteologie.org](http://www.dv-osteologie.org)
- 27 Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone*. 1996 Feb;18(2):97-102
- 28 Fitzgerald ER. Postmortem transition in the dynamic mechanical properties of bone. *Med. Physics* 1977; 4:49-53
- 29 Fogelman I, Blake GM, Blamey R, Palmer M, Sauerbrei W, Schumacher M, Serin D, Stewart A, Wilpshaar W. Bone mineral density in premenopausal women treated for node-positive early breast cancer with 2 years of goserelin or 6 months of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF). *Osteoporos Int*. 2003 Dec;14(12):1001-6. Epub 2003 Oct 3.
- 30 Friedlaender GE, et al. Effects of chemotherapeutic agents on bone. 1. Short term methotrexate and doxorubicin (Adriamycin) treatment in a rat model. *J Bone Joint Surg* 1984; 66A:602-607
- 31 Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner*. 1992 Sep;18(3):227-36.
- 32 Gaillard C, et al. Docetaxel (Taxotere) metabolism in the rat in vivo and in vitro. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1994; 35: 428
- 33 Genant HK, et al. Noninvasive assessment of bone mineral and structure- state of the art. *J Bone Mineral Res* 1996; 11:707-730

- 34 Gires P, et al. (14C-)Docetaxel disposition in the isolated perfused rat liver. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994; 19 Suppl 2: 29
- 35 Glackin CA, et al. Doxorubicin inhibits differentiation and enhances expression of the helix-loop-helix genes Id and mTwi in mouse osteoblastic cells. *Biochem Int* 1992;28:67-75
- 36 Glatt M. The bisphosphonate zoledronate prevents vertebral bone loss in mature estrogen-deficient rats assessed by micro-computed tomography. *European Cells and Materials* 2001; 1:18-26
- 37 Götte S, Dittmar K. Epidemiologie und Kosten der Osteoporose. *Der Orthopäde* 2001; 30: 402-4
- 38 Götte S, Dubs B. Osteodensitometrie. In: *Praktische Orthopädie*. 41. Tagung des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie e.V. Osteoporose. Herausgeber Hedtmann A und Götte S. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2002
- 39 Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 4:3-13.
- 40 Greep NC, et al. The effect of adjuvant chemotherapy on bone density in postmenopausal women with early breast cancer. *The American Journal of medicine* 2003; 114:653-659
- 41 Guay DR. Ibandronate: a new oral bisphosphonate for postmenopausal osteoporosis. *Consult Pharm*. 2005 Dec;20(12):1036-55.
- 42 Guay DR. Ibandronate, an experimental intravenous bisphosphonate for osteoporosis, bone metastases, and hypercalcemia of malignancy. *Pharmacotherapy*. 2006 May; 26(5):655-73.
- 43 Hadji P, et al. The epidemiology of osteoporosis-Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 2013; 110(4):52-7.DOI: 10.3238/arztebl.2013.0052
- 44 Hadji P, Bundred N. Reducing the risk of cancer treatment-associated bone loss in patients with breast cancer. *Semin Oncol*. 2007 Dec;34(6 Suppl 4):S4-10.
- 45 Hadji P, et al. The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in pre-menopausal women with breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009 Oct 20. [Epub ahead of print]

- 46 Hansen MA, et al.: Dual-energy x-ray absorptiometry: a precise method of measuring bone mineral density in the lumbar spine. *J Nucl Med* 1990; 31:1156-1162
- 47 Hassager C, Christiansen C: Measurement of bone mineral density (editorial). *Calcif Tissue Int* 1995; 57:1-5
- 48 Heidenreich A, Ohlmann CH. Ibandronate: its pharmacology and clinical efficacy in the management of tumor-induced hypercalcemia and metastatic bone disease. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2004 Dec; 4(6):991-1005
- 49 Hennequin C, et al. S-phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere) in synchronised HeLa cells. *Br J Cancer* 1995; 71: 1194-1198
- 50 Heuck A, et al. Knochendichtemessungen in der Osteoporosediagnostik. *Röntgenpraxis* 1989; 42: 155-165
- 51 Inoue K, Karashima T, Fukata S, Nomura A, Kawada C, Kurabayashi A, Furihata M, Ohtsuki Y, Shuin T. Effect of combination therapy with a novel bisphosphonate, minodronate (YM529), and docetaxel on a model of bone metastasis by human transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6669-77.
- 52 Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK. Therapeutic effect of risedronate on cancellous and cortical bone in ovariectomized osteopenic rats: a comparison with the effects of alfacalcidol. *Exp Anim.* 2006 Jul;55(4):333-42
- 53 Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone.* 1998 Aug;23(2):155-61
- 54 Järvinen TL, Sievänen H, Kannus P, Järvinen M. Dual-energy X-ray absorptiometry in predicting mechanical characteristics of rat femur. *Bone.* 1998 May; 22(5): 551-8
- 55 Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung. 11.Auflage 2003: Kapitel 12.4 Zytostatika: S. 660-670
- 56 Kalu D. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral* 1991;15:175-192

- 57 Kanis JA, Devogelaer JP, Gennari C: Practical guide for the use of bone mineral measurements in the assessment of treatment of osteoporosis: a positive paper of the European foundation for osteoporosis and bone disease. The Scientific Advisory Board and the Board of National Societies. *Osteoporos Int* 1996; 6:256-261
- 58 Konnopka A, et al.: The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany: estimation for 2001 and projection until 2050. *Osteoporosis Int* 2009; 20: 1117-29.
- 59 Leppänen O, Sievänen H, Jokihaara J, Pajamäki I, Järvinen TL. Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *J Bone Miner Res.* 2006 Aug;21(8):1231-7
- 60 Letterie GS. Anovulation in the prevention of cytotoxic-induced follicular attrition and ovarian failure. *Hum Reprod.* 2004 Apr;19(4):831-7. Epub 2004 Feb 12.
- 61 Linde F, Hvid I, Madsen F: The effect of specimen geometry on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens. *J Biomech* 1992; 25:359-368
- 62 Mahon SM. Osteoporosis: A concern for cancer survivors. *ONF* 1998; 25(5):843-851
- 63 Marlard M, et al. kinetics, distribution, metabolism and excretion of radiolabelled Taxotere (14C-RP 56976, docetaxel) in mice and dogs. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1993; 34: 393
- 64 Mathelin C, Brettes JP, Diemunsch P. [Premature ovarian failure after chemotherapy for breast cancer] *Bull Cancer.* 2008 Apr 1;95(4):403-12.
- 65 May KP, et al. The effect of methotrexate on mouse bone cells in culture. *Arthritis Rheum* 1996;39:489-494
- 66 May KP, et al.: The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arthritis Rheum* 1994;37:201-206
- 67 McCune JS, Games DM, Espirito JL. Assessment of ovarian failure and osteoporosis in premenopausal breast cancer survivors. *J Oncol Pharm Pract.* 2005 Jun;11(2):37-43.

- 68 Nowińska B, Cegiela U, Folwarczna J, Sliwiński L, Kaczmarczyk-Sedlak I, Pytlik M, Janiec W. Effects of raloxifene on development of the methotrexate-induced changes in bone mechanical properties of male rats. *Pharmacol Rep.* 2007 May-Jun;59(3):359-64.
- 69 Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD003474.
- 70 Pfeilschifter J, Diel IJ. Osteoporosis due to cancer treatment: Pathogenesis and management. *Journal of Clinical Oncology* 2000b; 18(7):1570-1593
- 71 Product Monograph Taxotere: sanofi-aventis Canada Inc. 2150 St. Elzear Blvd. West, Laval, Quebec H7L 4A8 Date of Revision: September 24, 2012 Submission Control No.: 150484 s-a version 10.0 dated September 24, 2012; [products.sanofi.ca/en/taxotere.pdf](http://products.sanofi.ca/en/taxotere.pdf)
- 72 Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch.* 258. Auflage, S.265. Walter de Gruyter Verlag Berlin-New York 1998
- 73 Reginster JY, Paul I. Osteoporose: Definition, Klassifikation und Epidemiologie. In: *Praktische Orthopädie.* 41. Tagung des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie e.V. Osteoporose. Herausgeber Hedtmann A und Götte S. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2002
- 74 Reid DM, Doughty J, Eastell R, Heys SD, Howell A, McCloskey EV, Powles T, Selby P, Coleman RE. Guidance for the management of breast cancer treatment-induced bone loss: a consensus position statement from a UK Expert Group. *Cancer Treat Rev.* 2008;34 Suppl 1:S3-18. Epub 2008 Jun 2.
- 75 Ringe JD. Osteoporose: postmenopausale Osteoporose, senile Osteoporose, sekundäre Osteoporose, Osteoporose des Mannes. Thieme, Stuttgart, New York, 1995
- 76 Ringe JD. Osteoporose: Differentialdiagnostik und Differentialtherapie. *Praxiskompodium mit 34 ausgewählten Kasuistiken.* Thieme, Stuttgart, New York, 1997
- 77 Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (Taxotere). A semi-synthetic analog of Taxol. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83: 288-291
- 78 Roche Lexikon Medizin 4., neubearbeitete und erweiterte Auflage. Urban und Schwarzenberg Verlag München, Wien, Baltimore 1998

- 79 Rosen HN, et al.: Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: a comparison among DXA, histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:35-39
- 80 Santini D, et al. Bisphosphonate effects in cancer and inflammatory diseases: in vitro and in vivo modulation of cytokine activities. *BioDrugs*. 2004;18(4):269-78.
- 81 Schimmer RC, Bauss F. Effect of daily and intermittent use of ibandronate on bone mass and bone turnover in postmenopausal osteoporosis: a review of three phase II studies. *Clin Ther*. 2003 Jan;25(1):19-34.
- 82 Seitz M, et al. Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. *Arthritis Rheum* 1998; 44:2032-2038
- 83 Shapiro CL, Manola J, Leboff M. Ovarian failure after adjuvant chemotherapy is associated with rapid bone loss in women with early-stage breast cancer. *Journal of clinical oncology* 2001; Vol 19, No14:3306-3311
- 84 Shapiro CL, et al. Chemotherapy-induced ovarian failure (CHEMO OV FAIL) is associated with significant bone loss in early stage breast cancer patients. *Proceeding Annual Meeting American Society of Clinical Oncology*, 1997;16 A500
- 85 Spadaro JA, Damron TA, Horton JA, Margulies BS, Murray GM, Clemente DA, Strauss JA. Density and structural changes in the bone of growing rats after weekly alendronate administration with and without a methotrexate challenge. *J Orthop Res*. 2006 May;24(5):936-944.
- 86 Stepan J, et al. Castrated men exhibit bone loss: effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodelling. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69:523-527
- 87 Stewart CA, et al. Heterotopic ossification. Effect on dual-photon absorptiometry of the hip. *Clin Nucl Med* 1990; 15: 677-700
- 88 Stupphann D, Pietschmann P. Sekundäre Osteoporose – Abgrenzung zur primären Osteoporose. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2008; 15 (1), 2-5 [www.kup.at/mineralstoffwechsel](http://www.kup.at/mineralstoffwechsel)



- 89 Takada M, et al. Accuracy and precision study in vitro for peripheral quantitative computed tomography. *Osteoporosis Int* 1996; 6:207-212
- 90 Trudeau ME, et al. Docetaxel in patients with metastatic breast cancer: a phase II study of the National Cancer Institut of Canada-Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 1996; 14: 422-428
- 91 Van Beek ER, et al. Synergistic effect of bisphosphonate and docetaxel on the growth of bone metastasis in an animal model of established metastatic bone disease. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 92 Van der Veen, et al. In vitro effects of methotrexate on human articular cartilage and bone-derived osteoblasts. *Br J Rheumatol* 1996;35:342-349
- 93 Vanin CM, MacLusky NJ, Chachra D, Kasra M, Grynepas MD, Casper RF. Lumbar vertebral density and mechanical properties in aged ovariectomized rats treated with estrogen and norethindrone or norgestimate. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Nov;173(5):1491-8
- 94 Vetter, C. Osteoporose: Neues Bisphosphonat als Monatstablette. *Dtsch Arztebl* 2005; 102(44): A-3043
- 95 Wang TM, Shih C: Study of histomorphometric changes of the mandibular condyles in neonatal and juvenile rats after administration of cyclophosphamide. *Acta Anat* 1986;127:93-99
- 96 Wheeler DL, et al.: The short- and longterm effects of methotrexat on the rat skeleton. *Bone* 1995;16:215-221
- 97 Wronski TJ, Yen C-F. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cells and Materials Suppl* 1991;1:69-74
- 98 Wüster C, et al. Methylpentylaminopropylidenebisphosphonate (BM 21.0955): a new potent and safe bisphosphonate for the treatment of cancer-associated hypercalcemia. *Bone Miner* 1993; 22(2): 77-85
- 99 Wüster C, et al. Therapie der Osteoporose mit Bisphosphonaten. In: *Praktische Orthopädie*. 41. Tagung des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie e.V. Osteoporose. Herausgeber Hedtmann A und Götte S. Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2002

100 Xian CJ, Cool JC, van Gangelen J, Foster BK, Howarth GS. Effects of etoposide and cyclophosphamide acute chemotherapy on growth plate and metaphyseal bone in rats. *Cancer Biol Ther*. 2007 Feb;6(2):170-7. Epub 2007 Feb 5.

101 Xian CJ, Cool JC, Scherer MA, Macsai CE, Fan C, Covino M, Foster BK. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects. *Bone*. 2007 Aug 14;

102 Young DM, et al. Chemical and morphologic alterations of rabbit bone induced by Adriamycin. *Calcif Tissue Res* 1975;18:47-63

## **Danksagungen**

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Kurth für die Bereitstellung und Betreuung dieser überaus interessanten Forschungsarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. Serban-Dan Costa für die Übernahme meiner Dissertation.

Ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Anja Müller für die herzliche unkomplizierte Betreuung und die vielen nützlichen Tipps.

Ein großes Dankeschön geht auch an das Team der Zentralen Forschungseinrichtung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt für die Mitbetreuung unserer Versuchstiere, insbesondere an Herrn Dr. Alf Theisen für die tierärztliche Beratung.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der biomechanischen Tests ein großes Dankeschön an das Team des Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Ulm sowie der OHSU („Oregon Health Sciences University“), Portland/Oregon (USA). Besonders Herr Prof. Dr. Peter Augat stand mit vielen nützlichen Tipps stets zur Seite.

Herrn Dr. Hanns Ackermann aus dem Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt mein herzlichster Dank für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und der kostenlosen Bereitstellung des Statistikprogrammes.

Bei meinem Mann Dr. Angelos Gazis möchte ich mich ebenfalls bedanken für die rezidivierenden Motivationsschübe zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt ein besonderes Danke an die Versuchstiere, die im Dienste der Wissenschaft für diese Arbeit ihr Leben ließen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Wirkung von Docetaxel auf die Knochenmineraldichte und biomechanische Eigenschaften des Knochens– Untersuchungen an einem Tiermodell ovariectomierter Ratten“

in der Orthopädischen Universitätsklinik Friedrichsheim gGmbH in Zusammenarbeit mit der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/M. sowie der Forschungseinrichtung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt/M.

mit Unterstützung durch

- das Institut für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik Ulm,
- der Oregon Health Sciences University, Portland, Oregon. U.S.A. sowie
- dem Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung der J.-W.-Goethe-Universität Frankfurt/M.

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, \_\_\_\_\_

Ort, Datum

Katharina Gazis

## **Darstellung des Bildungsweges**

28.07.1978 geboren in Meißen (Sachsen) als Tochter von Kristina Becker, geborene Biedermann und Roland Becker

### Schulausbildung

Sept. 1985-Juli 1991 Grundschule in der 1. POS Meißen  
Aug. 1991-Juli 1992 Leistungsjahr in der EOS Meißen  
Aug. 1992-Juli 1997 St.-Afra-Gymnasium Meißen; Abschluß Abitur

### Weiterer Werdegang

Juli 1998-März 1999 Militärische Ausbildung bei der Bundeswehr im Rahmen meiner Verpflichtung zum Zeitsoldaten im Sanitätsdienst

### Universitäre Ausbildung

April 1999 Immatrikulation an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main für Humanmedizin  
April 2001 Physikum  
April 2002 1. Staatsexamen  
April 2004 2. Staatsexamen  
April 2004 Beginn des Praktischen Jahres (1. und 2. Tertial)  
Dez. 2004-Juli 2005 Unterbrechung des Praktischen Jahres aufgrund der Geburt unseres 1. Kindes  
Aug.-Dez. 2005 Fortsetzung des Praktischen Jahres (3. Tertial)  
März 2006 3. Staatsexamen  
Mai 2006 Approbation als Ärztin

### Berufstätigkeit

10/2006-01/ 2008 Assistenzärztin am Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie bei Chefarzt PD Dr. med. E. Kollig in Vollzeit

04/2010 bis 11/2012 mit 30 Wochenstunden tätig als Assistenzärztin im Klinikum Magdeburg, Abteilung Innere Medizin bei Chefarzt Prof. Dr. med. Schmidt

12/2012 bis 11/2013 Weiterbildungsassistentin in der Hausarztpraxis Dres. med. Zimmermann, 39112 Magdeburg in Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin

12/2013 bis 2/2014 Weiterbildungsassistentin in der Praxis für Dermatologie und Allergologie bei  
Frau Dr.med. Anke Raschke

seit 3/2014 Weiterbildungsassistentin im Sanitätszentrum Burg (Clausewitzkaserne) im Rahmen  
meiner Tätigkeit als Zeitsoldat bei der Bundeswehr

Magdeburg,

Ort, Datum

---

Katharina Gazis